SYNTHESE DER B-KETTE DES HUMANINSULINS MIT DER LIQUID-PHASE-METHODE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Reinhard Eberle
aus Stuttgart

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0069

SYNTHESE DER B-KETTE DES HUMANINSULINS MIT DER LIQUID-PHASE-METHODE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Reinhard Eberle
aus Stuttgart

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 1979

Dekan:	Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. M. Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von November 1976 bis September 1978 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer, danke ich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit.

Für Beate

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	Methoden der Peptidsynthese	1
1.1.	Einleitung	1
1.2.	Schutzgruppen	2
1.3.	Kupplungsmethoden	2
1.4.	Strategie der Peptidsynthese	3
1.4.1.	Klassische Synthese	3
1.4.2.	Die Solid-Phase-Methode	3
1.4.3.	Die Polymer-Reagenz-Methode	4
1.4.4.	Die Letsinger-Methode	5
1.4.5.	Lösliche Polystyrolträger	5
1.4.6.	Die Liquid-Phase-Methode	6
1.4.7.	Die Fest-Flüssig-Phasen-Methoden	7
2.	Problemstellung	8
3.	Insulin	8
3.1.	Insulin allgemein	8
3.2.	Biosynthese	9
3.3.	Synthese von Insulin	11
4.	Synthese der B-Kette des Humaninsulins	12
4.1.	Synthese der Insulin-B-Kette an Polyethylenglykol	12
4.1.1.	Vorbereitung des Polymers	12
4.1.2.	Synthesezyklus nach der Liquid-Phase-Methode	14
4.1.3.	Schutzgruppenwahl und Kupplungsmethode	16
4.1.4.	Verlauf der Synthese	17

4.2.	Aufarbeitung des polymergebundenen Dekapeptids B_{30-21}	19
4.2.1.	Schutzgruppenabspaltung mit Fluorwasserstoff	19
4.2.2.	Hydrogenolytische Spaltung des Peptidesters	20
4.2.3.	Verlauf der Synthese	20
4.3.	Aufarbeitung der polymergebundenen Insulin-B-Kette	21
4.3.1.	Schutzgruppenabspaltung mit Fluorwasserstoff	21
4.3.2.	Alkalische Hydrolyse des Peptidesters	23
4.3.3.	Charakterisierung des Peptids	23
4.4.	Diskussion	26
5.	Kinetische Untersuchung von Fragmentkupplungen	27
5.1.	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten	28
5.1.1.	Das EDTQ-Programm	
5.1.2.	Die formale Integration	31
5.2.	Ergebnis der kinetischen Messungen	33
5.3.	Diskussion der Ergebnisse	33
II.	EXPERIMENTELLER TEIL	36
1.	Allgemeines	36
1.1.	Verzeichnis der Abkürzungen	36
1.2.	Geräte und Instrumente	37
1.3.	Lösungsmittel und Chemikalien	38
1.4.	Allgemeine Arbeitsvorschriften	39
1.4.1.	Aminosäureanalysen	39
1.4.2.	Racemisierungstest	39
1.4.3.	Dünnschichtchromatographie	40
2.	Darstellung der Ausgangsverbindungen	41
2.1.	Darstellung der Aminosäurederivate	41
2.2.	Darstellung von BOC-Arg(MBS)-OH	41

3.	Darstellung von $(Gly)_3$-O-Et x HCl	43
3.1.	BOC-Gly-Gly-O-Et	43
3.2.	H-Gly-Gly-O-Et x HCl	44
3.3.	BOC-Gly-Gly-Gly-O-Et	44
3.4.	H-Gly-Gly-Gly-O-Et x HCl	45
4.	Darstellung von BOC-Ala-Leu-Gly-ONP	46
4.1.	BOC-Leu-Gly-OMe	46
4.2.	H-Leu-Gly-O-Me x TFA	46
4.3.	BOC-Ala-Leu-Gly-O-Me	47
4.4.	BOC-Ala-Leu-Gly-OH	47
4.5.	BOC-Ala-Leu-Gly-ONP	48
5.	Synthese der B-Kette des Humaninsulins	48
5.1.	Vorbereitung des Polymers und Fixierung der C-terminalen Aminosäure	48
5.1.1.	Veresterung von BOC-Gly mit $PEG_{20\ 000}$	48
5.1.2.	Abspaltung der Schutzgruppe	49
5.1.3.	Einführung der Ankergruppe	49
5.1.4.	Veresterung der carboxylendständigen Aminosäure	50
5.2.	Synthese des Peptids	50
5.2.1 -		52
5.2.29.	Kurze Skizzierung der einzelnen Syntheseschritte	66
5.3.	Aufarbeitung des Dekapeptids B_{30-21}	66
5.3.1.	Abspaltung mit HF	67
5.3.2.	Hydrogenolytische Abspaltung	68
5.4.	Aufarbeitung der polymergebundenen Insulin-B-Kette mit Fluorwasserstoff	71
5.4.1.	Schutzgruppenabspaltung mit HF	71
5.4.2.	Oxidative Sulfitolyse	72
5.4.3.	Ionenaustauschchromatographie	72
5.4.4.	Charakterisierung des Produkts	73

5.5.	Abspaltung der polymergebundenen Insulin-B-Kette mit Natronlauge	74
5.5.1.	Alkalische Hydrolyse der Peptid-Benzylester-Bindung	74
5.5.2.	Schutzgruppenabspaltung mit Fluorwasserstoff	75
5.5.3.	Oxidative Sulfitolyse	75
5.5.4.	Ionenaustauschchromatographie	75
5.5.5.	Charakterisierung des Produkts	75
5.6.	Aktivitätstest	79
5.6.1.	Reduktion von natürlicher Tetra-thiosulfat-A-Kette	79
5.6.2.	Darstellung von Hybridinsulin	79
5.6.3.	Aktivitätstest	79

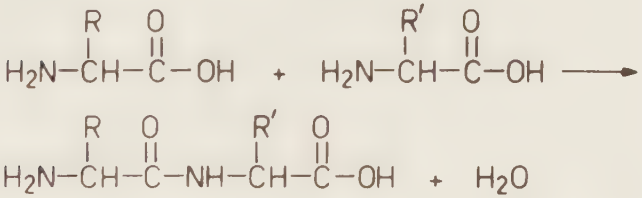
III.	ZUSAMMENFASSUNG	81
IV.	LITERATURVERZEICHNIS	83

I. ALLGEMEINER TEIL

1. Methoden der Peptidsynthese

1.1. Einleitung

Die Knüpfung der Peptidbindung beruht formal auf der Acylierung der Aminogruppe einer Aminosäure durch eine zweite Aminosäure:



Durch den nucleophilen Angriff des N-Atoms der zweiten Komponente auf das Carboxyl-C-Atom wird prinzipiell die Peptidbindung geknüpft. Jedoch ist die Fähigkeit der Aminosäuren, in dieser Weise miteinander zu reagieren, sehr eingeschränkt.
Zur gezielten Peptidsynthese müssen drei Punkte erfüllt sein:

1. Die Carboxylgruppe einer Aminosäure muss aktiviert sein.
2. Um nur ein Produkt zu erhalten, muss die Aminogruppe der aktivierten Aminosäure, sowie alle sonstigen funktionellen Gruppen - mit Ausnahme der an der Peptidbindung beteiligten NH_2-Cruppe - während der Synthese geschützt werden.

3. Die Verbindung muss unter Beibehaltung der optischen Reinheit der beiden Aminosäuren erfolgen (keine Racemisierung).

Die Chemie der Peptidsynthese kann daher in die Gebiete Schutzgruppentechnik und Kupplungsmethoden eingeteilt werden.

1.2. Schutzgruppen

Zwei Arten von Schutzgruppen sind erforderlich: solche, die vorübergehend bei einem bestimmten Syntheseschritt die nicht beteiligten α-Amino- und α-Carboxylgruppen schützen und solche, die weitere funktionelle Gruppen für den ganzen Verlauf der Peptidsynthese blockieren. Alle Schutzgruppen müssen schliesslich nach beendeter Synthese einfach zu entfernen sein, d.h. das oft empfindliche Endprodukt darf durch die Deblockierung nicht verändert werden. Eine umfangreiche Übersicht über Schutzgruppen findet sich in der angegebenen Literatur (1,2,3,4).

1.3. Kupplungsmethoden

Alle Methoden zur Knüpfung der Peptidbindung beruhen auf einer Aktivierung der an der Reaktion beteiligten Carboxylkomponente. Die Kupplung muss möglichst vollständig ablaufen, Racemisierung muss unterbleiben. Gegenwärtig sind etwa fünfzig verschiedene Kupplungsmethoden bekannt. Für den Aufbau grösserer Peptide haben sich aber nur einige Synthesevarianten als leistungsfähig erwiesen, und zwar die DCCI-Methode (5), die Azid-Kupplung (6), die Verwendung gemischter Anhydride (7-9) und der von Bodanszky gefundene Einsatz von p-Nitrophenylestern.

1.4. Strategie der Peptidsynthese

1.4.1. Klassische Synthese

Bei der klassischen Synthese werden die geschützten Komponenten in homogener Lösung gekuppelt. Nach jedem Reaktionsschritt wird das entstandene Peptid durch Kristallisation oder Säulenchromatographie gereinigt. Es können mehrere grössere Fragmente dargestellt und anschliessend durch Fragmentkondensation zum gewünschten Peptid verknüpft werden (10,11). Ebenso ist der rein stufenweise Aufbau unter weitestgehender Ausschaltung von Nebenprodukten möglich (12). Die Synthesemethode hat sich für die Darstellung von Peptiden bis zu 30 Aminosäureresten gut bewährt. Von dieser Sequenzgrösse an gibt es jedoch grosse Schwierigkeiten mit der Löslichkeit. Ausserdem sind die Reinigungsschritte nach jeder Synthesestufe oft sehr zeitraubend. Dafür können aber vollkommen reine Produkte erhalten werden. Polypeptide wie ACTH (11), Insulin (14), Glucagon (11) und Secretin (12,13) wurden nach dieser Methode synthetisiert.

1.4.2. Die Solid-Phase-Methode

Um die Nachteile der klassischen Synthese zu umgehen, wurde 1963 von R.B. Merrifield (15) die Peptidsynthese am unlöslichen Träger eingeführt. Das prinzipiell Neue an dieser Methode besteht darin, dass alle zeitraubenden Reinigungsschritte nach jedem Kupplungsschritt durch einen Filtriervorgang ersetzt werden. Im ersten Schritt der Synthese wird die geschützte, carboxylendständige Aminosäure mit einem unlöslichen Polymer verestert. Als Polymere können vernetztes Polystyrol, Phenol-Formaldehyd-Harze (16,17), Bürstenharze (18), Pellicular-Harze (19) oder modifiziertes Sephadex G 25 (20) verwendet werden. Nach Abspalten der Schutz-

gruppe wird das Polymerpeptid mit einem grossen Überschuss der nächsten, aktivierten Aminosäure umgesetzt. Nach beendeter Kupplung werden die nicht umgesetzten Aminosäurederivate mit einem geeigneten Lösungsmittel herausgewaschen. Am Ende der Synthese wird das Peptid vom unlöslichen Träger abgespalten und gereinigt.
Durch die Anwendung hoher Überschüsse werden grosse Reaktionsausbeuten erzielt. Ausserdem kann die Synthese wegen der Einfachheit der Arbeitsweise automatisiert werden (21,22). Da aber quantitativer Umsatz sowie vollständige Entfernung der Schutzgruppen nicht immer erreicht werden können, entstehen Rumpf- und Fehlsequenzen (23,24), die sich nach Abspalten vom Träger nur schwer und oft gar nicht vom gewünschten Peptid abtrennen lassen. Ausserdem wird der Syntheseverlauf durch das heterogene System und sterische Faktoren beeinträchtigt (25-30).
Mit dieser Methode wurden mit geringem Zeitaufwand viele biologisch interessante Oligopeptide wie Oxytoxin (31-33) und Polypeptide wie Bradykinin (34,35), die Insulin A-Kette (36), Ribonuclease A (37) und Secretin (38) synthetisiert.

1.4.3. Die Polymer-Reagenz-Methode

Eine Verbindung zwischen klassischer, stufenweiser Synthese und der Solid-Phase-Methode ist die Polymerreagenzmethode (39). Es werden N-geschützte, aktivierte Aminosäurederivate, die mit einem unlöslichen Polymer verestert sind, mit Peptidestern zur Reaktion gebracht. Durch einen hohen Überschuss an aktivierter Aminosäure können hohe Reaktionsausbeuten erzielt werden. Das überschüssige Reagenz wird abzentrifugiert und das lösliche Peptid fällt bei quantitativer Reaktion rein an.
Mit zunehmender Kettenlänge des Peptids werden die Kupplungsausbeuten durch sterische Effekte geringer, ausserdem sind der Methode durch die Löslichkeit des Peptids Grenzen ge-

setzt. Es konnten aber einige Oligopeptide (40,41) sowie Bradykinin (42) in guten Ausbeuten dargestellt werden.

1.4.4. Die Letsinger-Methode

Diese Synthesevariante wurde 1963 von R.P. Letsinger und M.J. Kornett beschrieben (43,44). Im Gegensatz zur Merrifield-Methode wird das Peptid vom N-terminalen Ende her an einem Popcorn-Copolymerisat aus Styrol und Divinylbenzol aufgebaut. Wegen des geringen Vernetzungsgrades ermöglichen diese Polymere eine gute Diffusion. Ausserdem kann das Peptid leicht vom Träger abgespalten werden. Der Nachteil dieser Methode liegt in der erhöhten Racemisierungsgefahr bei der Aktivierung der Carboxylgruppe und dem Mangel geeigneter Carboxylschutzgruppen.

1.4.5. Lösliche Polystyrolträger

Um die Nachteile des heterogenen Reaktionssystems bei der Solid-Phase-Peptidsynthese zu umgehen, setzen Shemyakin und Mitarbeiter (45) ein chlormethyliertes, lösliches Polystyrol mit einem Molekulargewicht von 200.000 als polymerem Träger ein. Der Aufbau des Peptids erfolgt stufenweise vom C-terminalen Ende her. Die Überschüsse werden nach jeder Kupplung durch Ausfällen des Polymerpeptids abgetrennt.
Diese vorteilhafte Strategie wird beeinträchtigt durch die Bildung von Einschlüssen beim Fällen des Polymers (46), die schlechten Abspaltungsausbeuten nach Beendigung der Synthese und die zunehmende Vernetzung des Polymers im Verlauf der Synthese.

1.4.6. Die Liquid-Phase-Methode

E. Bayer und M. Mutter fanden 1971 eine Methode, welche die Vorteile der Merriefield-Synthese mit denen der klassischen Synthese verbindet (47-51). Wie bei Merriefield wird die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure mit einem Polymer verestert. Nur verwendet man als Polymer Polyethylenglykol (PEG), das in den bei der Peptidsynthese verwendeten Lösungsmitteln wie Methylenchlorid, Chloroform, Essigester und Dimethylformamid sehr gut löslich ist. Deshalb tritt der entscheidende Nachteil der Solid-Phase-Methode, nämlich das Arbeiten unter heterogenen Reaktionsbedingungen, in der Liquid-Phase-Peptidsynthese nicht auf. Hauptsächlich kommt Polyethylenglykol im Molekulargewichtsbereich von 6.000 - 20.000 zum Einsatz. Jedes Molekül trägt nur zwei funktionelle Gruppen, so dass sterische Hinderung bei der Kupplung nicht auftritt. Während der Entwicklungszeit dieser Synthesestrategie wurden nach jeder Kupplung überschüssige Aminosäurederivate durch Ultrafiltration abgetrennt, was sehr viel Zeit in Anspruch nahm. Seit der Einführung der Kristallisationsmethode (52) werden die Überschüsse einfacher durch Ausfällen des Polymerpeptids abgetrennt, das kristallin ausfällt. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kupplungsgeschwindigkeiten der PEG-veresterten Aminosäuren mit denen der klassischen Peptidsynthese vergleichbar sind.
Der Peptidaufbau erfolgt stufenweise ohne Zwischenreinigung. Die Synthese kann dabei ohne grossen Aufwand analytisch verfolgt werden durch die Titrationsmethode (54-56), den Fluramtest (57,58), Dünnschichtchromatographie und den Dansyltest (59). Der einfache, immer wiederkehrende Synthesezyklus macht eine Automatisierung möglich. Eine halbautomatische Syntheseapparatur wurde bereits entwickelt (61, 149).
Die Abspaltung vom Träger kann durch alkalische Hydrolyse oder Hydrazinolyse erfolgen. Bei der Synthese grösserer

Peptide verläuft die Abspaltung aber nur mit sehr geringen Ausbeuten (60). Deshalb wird die C-terminale Aminosäure über ein Zwischenglied an den polymeren Träger gebunden und liegt so als Benzylester vor. Damit kann das Peptid sauer oder hydrogenolytisch vom Träger abgespalten werden (62).
Nach dieser Methode wurden bisher einige biologisch aktive Oligopeptide wie Substanz P (51), Oxytocin (56), LHRH (63) sowie die kupplungsfähigen Fragmente für eine Secretin-Totalsynthese (64) hergestellt.

1.4.7. Die Fest-Flüssig-Phasen-Methoden

In Tübingen wurden zwei Verfahren entwickelt, welche die Liquid- und die Solid-Phase-Methode miteinander verbinden. Der C-Terminus des gewünschten Peptids wird mit einem löslichen Träger, meist Polyethylenglykol, verestert. Bei der Methode nach Frank und Hagenmaier (65,66) wird die α-Aminofunktion der zu kuppelnden Aminosäure über ein Zwischenglied an ein unlösliches, vernetztes Polystyrol gebunden. Anschliessend wird die Carboxylfunktion aktiviert. Bei jedem Reaktionsschritt erfolgt die Bindung des gewünschten Produkts an den unlöslichen Träger oder dessen Abspaltung vom unlöslichen Träger. Unumgesetztes Peptid bzw. gewünschtes Produkt werden durch einen einfachen Filtrationsschritt entfernt. Quantitativer Umsatz ist so nicht erforderlich. Auf diese Weise wurde LHRH in grosser Reinheit dargestellt und in vivo getestet (67).
Bei der Methode nach Heusel, Jung und Mitarbeitern (68-70) wird das PEG-gebundene Peptid mit aktivierten, N-geschützten Aminosäureestern, die an eine unlösliche Matrix gebunden sind, umgesetzt. Das gewünschte Produkt wird vom unlöslichen Aminosäurederivat abfiltriert. Bei nicht vollständigem Umsatz wird die Kupplung wiederholt.

2. Problemstellung

Aus den vorhergehenden Ausführungen geht hervor, dass die Liquid-Phase-Methode eine ausgezeichnete Möglichkeit ist, auch grössere Peptide ohne grossen Zeitaufwand in vernünftigen Mengen darzustellen. Es war daher die Aufgabe dieser Arbeit, die B-Kette des Humaninsulins am polymeren Träger schrittweise aufzubauen, nach Abspaltung der Schutzgruppen zu identifizieren und das nach Rekombination mit natürlicher Insulin A-Kette entstandene Hybridinsulin auf biologische Aktivität zu prüfen.
Ausserdem sollten die vom Autor während seiner Diplomarbeit (71) begonnenen kinetischen Untersuchungen von Fragmentkupplungen in der Peptidsynthese weiter verfolgt werden.

3. Insulin

3.1. Insulin allgemein

Insulin besteht aus zwei linearen Polypeptiden, der A- und der B-Kette. Die A-Kette (acidic chain) enthält 21, die B-Kette (basic chain) 30 Aminosäuren. Zwei Disulfidbrücken verbinden beide Ketten, während das dritte Disulfid intrachenar in der A-Kette angeordnet ist (72,73).

Insulin wird in der Industrie in grossen Mengen gewonnen. Ausgangsmaterial sind Pankreata von Schwein und Rind. Die Primärstruktur des so gewonnenen Insulins unterscheidet sich von der des Humaninsulins in einigen wenigen Aminosäuren
(Schwein: B 30 Ala, Rind: A 8-10 Ala-Ser-Val,
B 30 Ala).

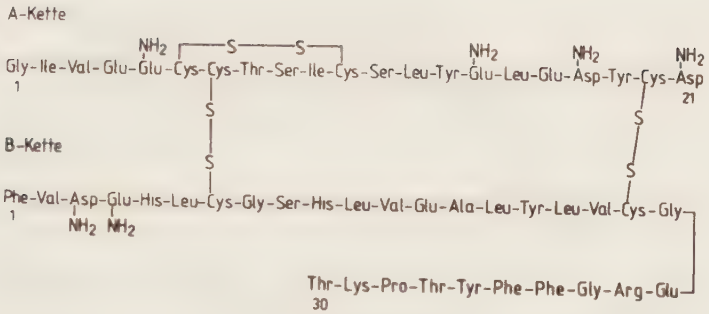


Abb. 1 Primärstruktur von Humaninsulin

3.2. Biosynthese

Das Hormon Insulin wird in den ß-Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas gebildet. Es entsteht aus einem einkettigen Vorläufer, dem Proinsulin (74,75).

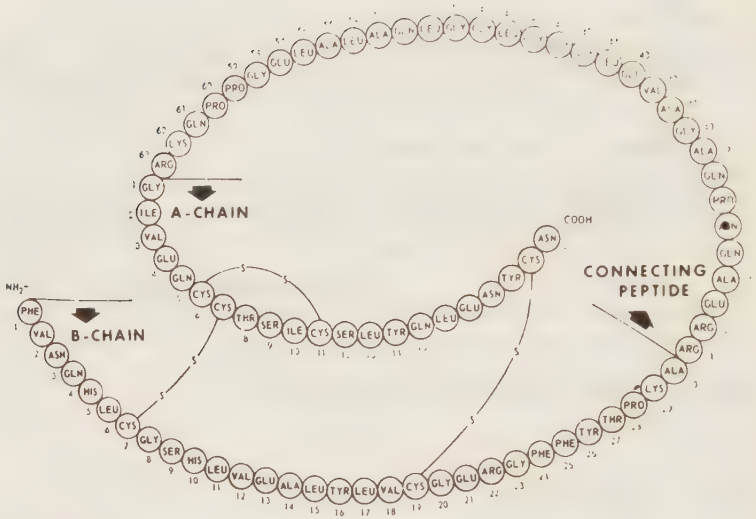


Abb. 2 Primärstruktur des Schweine-Proinsulins

Man erkennt, dass eine Sequenz von 33 Aminosäuren zwischen B-Kette und A-Kette eingeschoben ist. Diese wird enzymatisch aus dem Proinsulin herausgespalten, wobei die beiden basischen Aminosäuren Arginin bzw. Lysin, welche jeweils die Nahtstellen zum eigentlichen Insulin bilden, verloren gehen. Spaltprodukte sind somit Insulin und das C-Peptid mit 29 Aminosäuren.

Durch den Einschub der C-Kette ist aber gewährleistet, dass A- und B-Kette quantitativ über Disulfidbrücken miteinander verknüpft werden.

3.3. Synthese von Insulin

Für die chemische Synthese von Insulin sind heute prinzipiell drei verschiedene Wege möglich:

1. Getrennte Synthese der beiden Teilketten und deren Kombination zum Gesamtmolekül unter gezielter Knüpfung der Disulfidbrücken.
2. Aufbau des Gesamtmoleküls bei weitgehend formelgerechter Knüpfung der intra- und interchenaren Disulfidbrücken.
3. Der Umweg über eine Synthese von Proinsulin.

Obwohl bei Weg 1 in der Kombination der beiden Teilketten durch die Bildung zahlreicher isomerer Disulfide hohe Ausbeuteverluste (76) auftreten, ist er bis heute der einzige, der mit noch vertretbarem Aufwand Syntheseinsulin in präparativen Mengen erbringt. Auf diesem Weg wurde Insulin zuerst von einer deutschen Arbeitsgruppe (77,78) synthetisiert. Kurz danach folgten eine amerikanische (79) und eine chinesische (80) Arbeitsgruppe. Seither wurde an der Verbesserung dieser Synthesemöglichkeit gearbeitet. Der stufenweise Aufbau der beiden Teilketten (81,82) sowie die Fragmentkondensation (83) am festen Träger brachten einen erheblichen Zeitgewinn.
Durch die Einführung der "Brückenchemie" (84), bei der A- und B-Kette durch bifunktionelle Reagentien verknüpft werden, gelang ein wesentlicher Fortschritt in der zielgerichteten Knüpfung der Disulfidbrücken.
Weg 2 konnte kürzlich unter Verwendung zweier verschiedener S-Schutzgruppen sowie einer dreifachen Selektivitätsabstufung beim Schutz der α-Aminofunktion realisiert werden (85).
Aus der Erkenntnis, dass reduziertes Proinsulin (74) in hoher Ausbeute in die ursprüngliche Disulfidform rückführbar ist (86,87) lässt sich Weg 3 ableiten. Dazu wäre aber die Synthese eines linearen Peptids mit 84 Aminosäuren notwendig

und nach gelungener Disulfidbindung fällt die Hilfskomponente C-Kette als "Abfall" an.

4. Synthese der B-Kette des Humaninsulins

Die Insulin B-Kette ist schon mehrmals synthetisiert worden (88-93). Meist kam die klassische Synthesestrategie zur Anwendung. Es wurden mehrere Fragmente hergestellt, die dann zum Gesamtmolekül vereinigt wurden. Alle bisherigen Synthesen unterscheiden sich hauptsächlich in der Wahl der Schutzgruppen und Kupplungsmethoden. In diesem Kapitel wird der stufenweise Aufbau der B-Kette des Humaninsulins am löslichen Träger Polyethylenglykol (MG 20.000), sowie deren Abspaltung und Aufarbeitung beschrieben.

4.1. Synthese der Insulin-B-Kette an Polyethylenglykol

4.1.1. Vorbereitung des Polymers

Bei allen bisher in der Liquid-Phase-Methode durchgeführten Peptidsynthesen wurde die C-terminale Aminosäure direkt mit Polyethylenglykol verestert. Kürzere Peptide konnten unter milden alkalischen Bedingungen in guten Ausbeuten vom Träger abgespalten werden. Nach beendeter Synthese der Insulin-A-Kette (60) mit 21 Aminosäuren liess sich der aliphatische Peptidester auch unter drastischen Bedingungen nicht verseifen. Die Gründe dafür sind nicht bekannt.

Durch Einschieben einer Ankergruppe zwischen das Polymer und die C-terminale Aminosäure, die diese über eine Benzylesterbindung am Polymer fixiert, sollte es möglich sein, diese Nachteile zu beseitigen, da Benzylesterbindungen auch acidolytisch gespalten werden können. Dies konnte am Beispiel einiger Testpeptide gezeigt werden (62), die sich

acidolytisch und hydrogenolytisch nahezu quantitativ vom polymeren Träger abspalten liessen. Die hydrogenolytische Behandlung von Peptiden mit schwefelhaltigen Aminosäuren ist nicht ohne weiteres möglich. Aber eine Abspaltung mit Fluorwasserstoff ist in jedem Fall schonender als Alkalibehandlung. In Abbildung 3 wird die Vorbereitung des Polymers bis zur Fixierung der C-terminalen Aminosäure der B-Kette des Humaninsulins, Threonin, aufgezeigt.

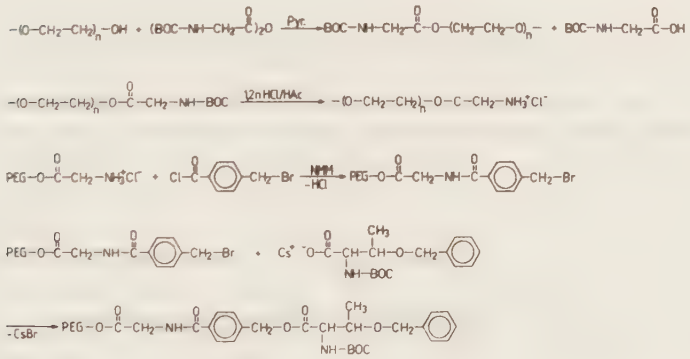


Abb. 3 Fixierung von BOC-Thr (Bzl) an PEG über eine Ankergruppe

Zunächst wird tert-Butyloxycarbonylglycin mit Polyethylenglykol (MG 20.000) verestert. Als Katalysator dient Pyridin. Nach einmaliger Wiederholung der Reaktion sind alle freien Hydroxylgruppen des Polyethylenglykols mit BOC-Glycin verestert. Nach Reinigung und Abspaltung der Schutzgruppe wird mit p-Brommethylbenzoesäurechlorid umgesetzt. Neutralisiert wird mit N-Methylmorpholin. Schon nach 30 Minuten sind mit Fluram keine freien Aminogruppen mehr nachweisbar.

Nun wird das Cäsiumsalz von BOC-Thr(Bzl)-OH mit dem Brombenzylpolymer in absolutem Dimethylformamid 7 Tage lang bei 40°C verestert. Nach Reinigung ergab die Aminosäureanalyse eine Beladung an Threonin von 50 %. Auch durch wiederholten Umsatz mit dem Cäsium-Salz von BOC-Thr(Bzl)-OH konnte diese Beladung nicht gesteigert werden.
Die Synthese wird begonnen mit 30 g Polyethylenglykol (MG 20.000), an das über ein Zwischenglied 1,5 mM C-terminale Aminosäure verestert sind.

4.1.2. Synthesezyklus nach der Liquid-Phase-Methode

Der nun folgende Aufbau der Insulin B-Kette am polymeren Träger folgt einem einfachen, standardisierten Synthesezyklus.

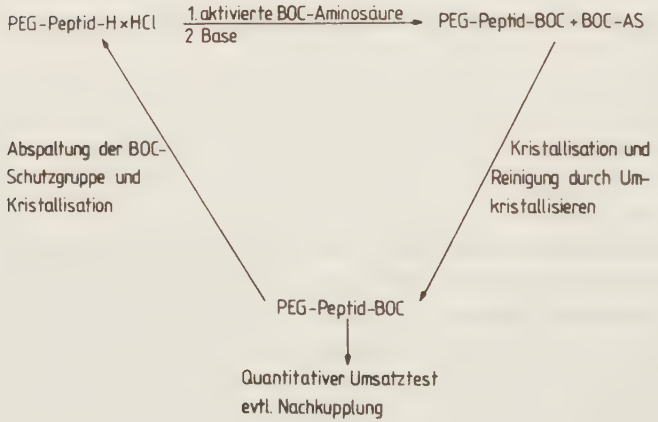


Abb. 4 Synthesezyklus der Liquid-Phase-Methode

Der Zeitaufwand für Kupplung und Umsatztest, anschliessende Reinigung und Abspaltung der BOC-Gruppe beträgt je nach dem zu kuppelnden Aminosäurederivat zwischen einem und zwei Tagen. Ein Polypeptid wie die Insulin B-Kette kann also in etwa zwei Monaten am polymeren Träger aufgebaut werden.

Die zwei alternierenden Syntheseschritte sollen hier kurz skizziert werden:

a) Abspaltungsschritt

Eine ca. 10 %ige Lösung des Polymerpeptids in 1,2 n Chlorwasserstoff/Eisessig wird hergestellt. Nachdem die Substanz vollständig in Lösung gegangen ist, wird 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Mit zunehmender Kettenlänge des Peptids nimmt die Löslichkeit stark ab. Es wird dann zur Schutzgruppenabspaltung Trifluoressigsäure verwendet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen, die Substanz in Methylenchlorid aufgenommen und mit Ether ausgefällt. Dies wird einmal wiederholt, um sämtliche Überschüsse an Säure zu entfernen. Mit zunehmender Länge des Peptids reicht Methylenchlorid als Lösungsmittel nicht mehr aus, und es wird auf Dimethylformamid bzw. ein Gemisch aus Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid übergegangen.

b) Kupplungsschritt

Eine möglichst konzentrierte Lösung des Polymerpeptids in Methylenchlorid bzw. Dimethylformamid wird hergestellt. Das zu kuppelnde Aminosäurederivat wird als symmetrisches Anhydrid zugegeben. Dabei wird vom entstandenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Neutralisiert wird mit N-Methylmorpholin. Nach zwei- bis sechsstündigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktion beendet und das Produkt ausgefällt. Es wird solange aus verschiedenen Lösungsmitteln umgefällt, bis dünnschichtchromatographisch keine Überschüsse mehr nachgewiesen werden können.
Als Umsatzkontrolle wird während der Kupplung mit dem

Fluramtest (57,58,150) auf noch vorhandene freie Aminogruppen geprüft. War der Umsatz nicht vollständig, so wird die Kupplungsreaktion wiederholt. Nach jedem Syntheseschritt wird eine Aminosäureanalyse durchgeführt.

4.1.3. Schutzgruppenwahl und Kupplungsmethode

Zum Schutz der α-Aminofunktion aller 16 zu kuppelnden Aminosäuren wird immer die t-Butyloxycarbonylgruppe verwendet. Die carboxylendständige Aminosäure ist über eine Benzylesterbindung an den polymeren Träger fixiert. Diese Bindung soll nach beendeter Synthese acidolytisch mit Fluorwasserstoff gespalten werden. Deshalb werden alle weiteren Schutzgruppen für die trifunktionellen Aminosäuren so gewählt, dass sie ebenfalls mit Fluorwasserstoff quantitativ entfernt werden können. Nur die Merkaptofunktion in Cystein wird so geschützt, dass sie in einem nachfolgenden Schritt im Rahmen einer oxidativen Sulfitolyse direkt in die Thiosulfatform übergeführt wird.
Threonin, Serin und Tyrosin werden als Benzylether eingesetzt. Die Guanidinofunktion von Arginin wird mit Methoxybenzolsulfochlorid umgesetzt.
Der Imidazol-Stickstoff in Histidin wird nur während des Kupplungsschritts mit der t-Butyloxycarbonylgruppe geschützt. Glutaminsäure wird als γ-Benzylester eingesetzt.

Die ε-Aminofunktion von Lysin wird durch die Benzyloxycarbonylgruppe geschützt.
Auf den Schutz der Säureamidfunktion von Glutamin wird verzichtet, da die zur Verfügung stehende Mbh-Schutzgruppe (94) unter den Bedingungen der Abspaltung der BOC-Gruppe nicht stabil ist.
Die Säureamidfunktion von Asparagin dagegen wird mit Mbh geschützt, da es bei der Aktivierung dieser Aminosäure zu Nebenreaktionen kommen kann (95).

Cystein wird mit der S-Isopropylgruppe derivatisiert. Die Disulfidbindung ist gegenüber Behandlung mit Trifluoressigsäure und Fluorwasserstoff stabil (96).
Alle Aminosäurederivate werden ausschliesslich mit Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungsreagens aktiviert. Die Herstellung der symmetrischen Anhydride erfolgt separat unter Kühlung in Methylenchlorid oder Tetrahydrofuran (97). Dadurch können die Kupplungsreaktionen auch in Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid ohne Erhöhung der Racemisierungsgefahr durchgeführt werden.

4.1.4. Verlauf der Synthese

Der Einsatz von Polyethylenglykol als solubilisierende, C-terminale Schutzgruppe hat sich bewährt. Es traten während der gesamten Synthese bezüglich der Löslichkeit keine Schwierigkeiten auf.
Die Kupplungsreaktionen konnten bis zum Undekapeptid mit der Sequenz B_{30-18} in reinem Methylenchlorid durchgeführt werden. Anschliessend musste auf Dimethylformamid übergegangen werden. Eine überraschende Verschlechterung der Löslichkeit ergab sich vorübergehend nach der Kupplung von Valin an der Stelle B_{12}. Es musste Dimethylsulfoxid zugesetzt werden. Nach der Kupplung von Histidin an der Stelle B_{10} war das Polymerpeptid in Dimethylformamid wieder gut löslich.
Die Abspaltung der BOC-Gruppe konnte bis zum Dekapeptid in 1,2 n Chlorwasserstoff/Eisessig durchgeführt werden. Anschliessend musste Trifluoressigsäure eingesetzt werden. Es dauerte oft bis zu zwanzig Minuten, bis die Substanz in Lösung gegangen war, so dass das Peptid insgesamt zwölf Stunden mit reiner Trifluoressigsäure behandelt wurde. Dies führte zu Nebenreaktionen am Tyrosin-Benzylether (98), wodurch die Werte von Tyrosin in der Aminosäureanalyse stetig sinken.

Die Kupplungsreaktionen verliefen mit guten Ausbeuten. Nur bei Histidin und Asparagin konnte quantitativer Umsatz nach Aminosäureanalyse nicht erreicht werden, obwohl die Reaktion laut Fluramtest vollständig abgelaufen war.
Die Proben zum Fluramtest wurden der Reaktionslösung in Abständen von fünfzehn Minuten entnommen. Erwies sich der Test nach vier Stunden noch als positiv, so wurde das Polymerpeptid gefällt und die Kupplung wiederholt.
Die Aminosäureanalyse ergab für die polymergebundene Insulin B-Kette nach der letzten Kupplung folgende Werte:

Hydrolyse: 6 n HCl, 24 Stunden, 110°C, Zusatz von einem Kristall Phenol

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys[+]
gef:	0,41	1,99	0,69	2,58	0,91	4,93	1,08	0,49
theor:	1	2	1	3	1	5	1	2

	Val	Leu	Tyr[++]	Phe	Lys	His	Arg
gef:	2,36	4,00	0,62	3,19	0,74	0,93	1,23
theor:	3	4	2	3	1	2	1

[+] Wert zu niedrig, da unvollständige Hydrolyse von S-Isopropylcystein

[++] teilweise Zersetzung unter den Hydrolysebedingungen

Am Ende der Synthese liegen in der erhaltenen Gesamtmenge von 14,6 g Polymerpeptid 3,0 g (0,8 Millimol) Insulin B-Kette vor.

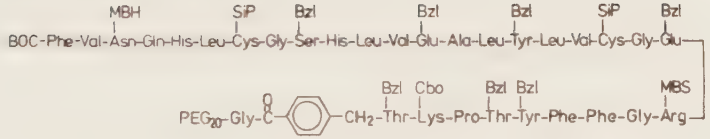


Abb. 5 Struktur des Polymerpeptids am Ende der Synthese

4.2. Aufarbeitung des polymergebundenen Dekapeptids B_{30-21}

Um einen ersten Überblick über den Syntheseverlauf zu erhalten, wurde ein Teil des Polymerpeptids auf der Stufe des Dekapeptids B_{30-21} abgezweigt. Dieses Peptid ist in Form verschiedener Derivate in der Literatur bereits mehrmals beschrieben (99-106). Es werden zwei verschiedene Abspaltungsmethoden angewendet, die bei kürzeren Peptiden in hohen Ausbeuten verlaufen (62). Das Dekapeptid B_{30-21} hat folgende Sequenz:

H_2N - Glu - Arg - Gly - Phe - Phe - Tyr - Thr - Pro - Lys-Thr - OH

Man kann neben der Behandlung mit Fluorwasserstoff auch eine hydrogenolytische Spaltung des Peptid-Benzylesters durchführen, da das Peptid keine schwefelhaltigen Aminosäuren enthält.

4.2.1. Schutzgruppenabspaltung mit Fluorwasserstoff

Das polymergebundene Peptid wird mit Fluorwasserstoff behandelt. Dadurch sollen alle Schutzgruppen quantitativ ent-

fernt werden, so dass am Ende das reine Peptid vorliegt. Anschliessende Gelchromatographie liefert ein reines Produkt.
Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgte mit einer Ausbeute von 64 %.
Die Aminosäureanalyse erbrachte folgendes Ergebnis:

	Thr	Glu	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys	Arg
gef:	2,13	0,82	1,06	1,00	0,61	2,14	0,87	0,89
theor:	2	1	1	1	1	2	1	1

4.2.2. Hydrogenolytische Spaltung des Peptidesters

Die hydrogenolytische Spaltung des Peptid-Benzylesters ist als ausserordentlich schonende Methode in der klassischen Peptidsynthese bekannt (107). Sie wird im Autoklaven unter Zusatz von Palladium auf Tierkohle als Katalysator durchgeführt. Anschliessende Gelchromatographie liefert ein reines Produkt. Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgte dabei zu 80 %.
Die Aminosäureanalyse erbrachte folgendes Ergebnis:

	Thr	Glu	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys	Arg
gef:	1,82	0,97	0,99	1,19	0,73	1,89	1,04	1,00
theor:	2	1	1	1	1	2	1	1

Die D-Anteile aller Aminosäuren liegen beim Racemisierungstest (120) unter 1,5 %. Nur für Tyrosin wurde ein etwas höherer Wert gefunden.

4.2.3. Verlauf der Synthese

Die Synthese des Dekapeptids mit der Sequenz B_{30-21} aus der B-Kette des Humaninsulins war ohne Einschränkung erfolgreich.

Die Aminosäureanalyse stimmt mit den theoretischen Werten sehr gut überein. Die Synthese verlief racemisierungsfrei.

Problematisch ist im Hinblick auf die Fortführung der Synthese zur Insulin B-Kette die unvollständige Spaltung der Peptid-Benzylesterbindung durch Fluorwasserstoff.

4.3. Aufarbeitung der polymergebundenen Insulin B-Kette

4.3.1. Schutzgruppenabspaltung mit Fluorwasserstoff

Die Schutzgruppen wurden so gewählt, dass sie bis auf die S-Isopropylgruppe bei Cystein in einem Arbeitsschritt mit Fluorwasserstoff entfernt werden können. Die Behandlung mit Fluorwasserstoff ist unbedenklich und führt nicht zu Nebenreaktionen (108,109).
Das erhaltene Hydrolyseprodukt wird einer oxidativen Sulfitolyse (110-112) unterworfen. Dabei wird die Disulfidbindung des S-Isopropylcystein gespalten und das Peptid liegt in der Bis-thiosulfatform vor. Durch anschliessende Ionenaustauschchromatographie wird das gewünschte Peptid von Polyethylenglykol sowie sonstigen Verunreinigungen abgetrennt.

Die zunächst durchgeführte Aminosäureanalyse der Polymerfraktion ergibt, dass nur 8 % des polymergebundenen Peptids vom Träger abgespalten werden konnten. Dies zeigt, dass der Peptid-Benzylester bei grossen Peptiden auch durch starke Säuren nur in sehr unbefriedigenden Ausbeuten hydrolysiert werden kann.
Aus zwei Gramm Polymerpeptid werden zehn Milligramm gewünschtes Peptid erhalten. Die Charakterisierung dieser Menge erfolgt durch Aminosäureanalyse, Racemisierungstest und IR-Spektroskopie.

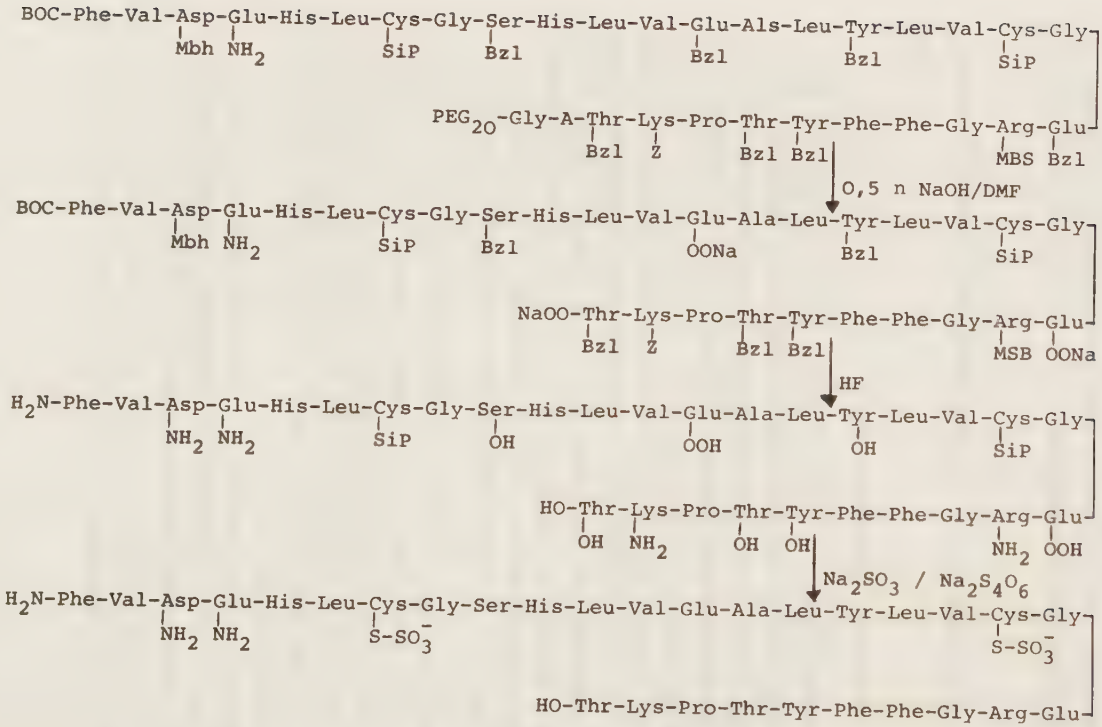


Abb. 6 Aufarbeitungsschema der polymergebundenen Insulin B-Kette

4.3.2. Alkalische Hydrolyse des Peptidesters

Da die Abspaltung vom polymeren Träger mit Fluorwasserstoff nur mit einer sehr unbefriedigenden Ausbeute verlief, wird der Peptidester mit Alkali behandelt. Dieser Schritt ist nicht unproblematisch, da erhöhte Racemisierungsgefahr besteht, ausserdem kann es zu Nebenreaktionen am Cystein kommen. Die Hydrolyse wird mit 0,5 n Natriumhydroxid/Dimethylformamid durchgeführt. Anschliessend werden die Schutzgruppen mit Fluorwasserstoff entfernt. Nach oxidativer Sulfitolyse und Ionenaustauschchromatographie zeigt die Aminosäureanalyse der Polymerfraktion, dass das Peptid zu 90 % vom polymeren Träger abgespalten werden konnte. Aus einem Gramm Polymerpeptid konnten so 30 Milligramm Insulin B-Kette in der Bis-Thiosulfatform erhalten werden. Die Charakterisierung des Peptids erfolgte durch Aminosäureanalyse, Racemisierungstest, IR-Spektroskopie und Niederspannungselektrophorese. Ausserdem wurde das nach Rekombination mit natürlicher A-Kette entstandene Hybridinsulin auf biologische Aktivität geprüft.

Eine Übersicht des hier beschriebenen Aufarbeitsungsweges zeigt Abbildung 6.

4.3.3. Charakterisierung des Peptids

a) Aminosäureanalyse

In Abbildung 7 sind die Werte der Aminosäureanalyse von folgenden vier Verbindungen gegenübergestellt:

1. Die vollgeschützte, polymergebundene Insulin-B-Kette
2. Die nach Aufarbeitung mit Fluorwasserstoff erhaltene Bis-thiosulfat-B-Kette des Humaninsulins.
3. Die nach Aufarbeitung mit Alkali erhaltene Bis-Thiosulfat-B-Kette des Humaninsulins.
4. Die nach Spaltung und Reinigung von natürlichem Rinderin-

sulin erhaltene Bis-Thiosulfat-B-Kette.

	1.	2.	3.	4.	Theorie
Asp	0,41	0,62	0,45	1,06	1
Thr	1,99	1,68	1,66	0,86	2 (1 bei B_{nat})
Ser	0,69	1,05	0,86	1,08	1
Glu	2,58	2,65	2,81	3,02	3
Pro	0,91	0,95	0,91	0,98	1
Gly	4,93	3,74	3,34	3,36	3
Ala	1,08	1,15	1,26	2,38	1 (2 bei B_{nat})
Cys	0,49^{+}	0,31	0,63^{++}	0,84^{++}	2
Val	2,36	2,75	2,33	2,98	3
Leu	4,00	4,00	4,00	4,00	4
Tyr	0,62	0,83	0,79	1,89	2
Phe	3,19	2,43	2,54	3,00	3
Lys	0,74	0,97	1,07	1,21	1
His	0,93	0,67	0,69	1,90	2
Arg	1,23	1,21	1,18	1,29	1

$^{+}$ Unvollständige Hydrolyse von S-Isopropylcystein

$^{++}$ Darstellung von Cystein als Cysteinsäure

Abb. 7 Gegenüberstellung der Aminosäureanalysen der Endprodukte.

Die Aminosäureanalyse bestätigt die schon während der Synthese gemachte Beobachtung, dass Asparagin und Histidin nicht quantitativ gekuppelt werden konnten. Ebenso ist die teil-

weise Zerstörung von Tyrosin während der Synthese nicht zu übersehen. Die Werte für alle anderen Aminosäuren stimmen recht gut überein.

b) Racemisierungstest

Die Prüfung auf Racematanteile (siehe II. 5.4.4. und II. 5.5.5.) erfolgt gaschromatographisch auf mit optisch aktivem Material beschichteten Glaskapillaren (119-121). Starke Racemisierung wurde nur bei Serin und Asparagin beobachtet, die bei der mit Alkali behandelten Substanz grösser war. Die D-Anteile aller anderen Aminosäuren liegen mit etwa 2 % in einer vertretbaren Grössenordnung.

c) Elektrophorese

Die erhaltene Bis-thiosulfat B-Kette wurde durch Niederspannungselektrophorese auf Papier geprüft. Als Referenz diente natürliche Bis-Thiosulfat-B-Kette des Rinderinsulins. Nach Besprühen mit Pauly's Reagens sind zwei Flecken sichtbar, von denen einer richtiges Laufverhalten zeigt.

d) Aktivitätstest

Die Rekombination mit natürlichem A-Ketten-Tetrathiosulfat erfolgte nach Katsoyannis (113,114). Dabei wird die natürliche A-Kette zunächst reduziert und anschliessend mit dem synthetischen B-Ketten-Derivat oxidiert. Das erhaltene Hybridinsulin kann direkt im biologischen Test eingesetzt werden (115-117).
Die Rekombinationsausbeute liegt bei diesem Verfahren zwischen 4 und 8 % (113). Das Produkt wird im Mäusefalltest auf biologische Aktivität untersucht (118) und zeigt eine signifikante Aktivität von 1 %.

4.4. Diskussion

Die stufenweise Synthese der vollgeschützten Insulin-B-Kette kann ohne Schwierigkeiten bezüglich der Löslichkeit durchgeführt werden. Die Kupplungen verlaufen bis zum Peptid mit 20 Aminosäuren quantitativ. Ab dieser Synthesestufe treten Schwierigkeiten auf, die bei Histidin und Asparagin nicht überwunden werden konnten, obwohl nachgekuppelt wurde. Die so entstandenen Fehlsequenzen werden auch chromatographisch nicht abzutrennen sein. Durch die langdauernde Behandlung des Peptids mit Trifluoressigsäure kommt es zu Nebenreaktionen am Tyrosin-Benzylether, was zu einer teilweisen Zerstörung von Tyrosin führt.

Die Abspaltung und Aufarbeitung des Dekapeptids B_{30-21} gelingt sowohl mit Fluorwasserstoff wie auch hydrogenolytisch in zufriedenstellenden Ausbeuten. Nach Gelchromatographie wird ein reines Peptids erhalten.

Die Abspaltung der Insulin B-Kette vom polymeren Träger mit Fluorwasserstoff gelingt nur mit sehr schlechten Ausbeuten. Lässt sich der Peptid-Benzylester bei kleinen Peptiden mit starken Säuren noch gut spalten, so ist dies bei Polypeptiden nicht mehr möglich.

Der daraufhin eingeschlagene Weg der alkalischen Hydrolyse führt zu guten Abspaltungsausbeuten. Allerdings tritt bei einigen Aminosäuren die erwartete starke Racemisierung ein. Nach Abspalten der Schutzgruppen und anschliessender oxidativer Sulfitolyse liegt das Peptid zu einem grossen Anteil in der Bis-thiosulfatform vor. Dies kann durch Elektrophorese und IR-Spektroskopie gezeigt werden.

Das nach Rekombination mit natürlicher A-Kette erhaltene Produktgemisch wird im Mäusefalltest auf biologische Aktivität untersucht und erbringt signifikante Aktivität.

Man kann daher davon ausgehen, dass in dem erhaltenen Syntheseprodukt die gewünschte B-Kette des Humaninsulins vorhanden ist. Allerdings ist der Syntheseerfolg durch die Bildung von Fehlsequenzen und Racemisierung beeinträchtigt.

Nach wie vor fehlt eine Methode, mit der ein Polypeptid schonend und quantitativ vom polymeren Träger abgespalten werden kann. Die bisher notwendigen drastischen Bedingungen müssen immer zu einer Schädigung des synthetisierten Peptids führen.

5. Kinetische Untersuchung von Fragmentkupplungen

In Tübingen wurden 1974 kinetische Untersuchungen (53) an der neuentwickelten Liquid-Phase-Methode zur Peptidsynthese durchgeführt. Aminosäure-PEG-Ester (MG 2.000 bis 20.000) wurden mit N-BOC-Aminosäure-Nitrophenylestern umgesetzt. Um einen direkten Vergleich zur Kinetik der klassischen Synthese zu haben, wurden die Messungen auch bei niedermolekularen Aminosäureestern durchgeführt.
Es zeigte sich, dass die Reaktionen nach der Liquid-Phase-Methode kinetisch einheitlich ablaufen. Die Geschwindigkeitskonstanten liegen im gleichen Bereich wie bei der klassischen Synthese, sind in manchen Fällen sogar grösser. Im Gegensatz dazu hatte man bei der anderen Synthesestrategie am polymeren Träger, der Solid-Phase-Methode, kinetisch uneinheitliches Verhalten festgestellt (46,122,151).
Bei allen untersuchten Reaktionen wurde als aktive, kupplungsfähige Komponente BOC-Gly-ONP eingesetzt. Die Messreihe wurde nun vervollständigt durch die kinetische Untersuchung von Fragmentkupplungen. Der Umsatz der PEG-Ester PEG-O-Gly x HCl und PEG-O-$(Gly)_3$ x HCl (MG des PEG: 20.000) mit dem als Modellpeptid gewählten Peptid-Aktivester BOC-Ala-Leu-Gly-ONP wurde vom Autor bereits beschrieben (123). Um das erhaltene Ergebnis deuten zu können, musste nun die gleiche Reaktion für die niedermolekularen Ester Gly-O-Et x HCl sowie $(Gly)_3$-O-Et x HCl durchgeführt werden.

5.1. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten

Das "EDTQ"-Programm (124) und die Methode der "Formalen Integration" (125) wurden angewendet, um die Geschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Die theoretischen Abhandlung dieser beiden Methoden wurde kürzlich von H. Mauser und J. Polster veröffentlicht (126).

5.1.1. Das EDTQ-Programm

Beim EDTQ-Programm müssen die Ausgangskonzentrationen A und B bei einer Reaktion vom Typ $A + B \longrightarrow C + D$ gleich sein. Die folgende Gleichung ist von Bedeutung:

$$(E_\lambda - E'_{o\lambda}) / (t - t') = k\, a\, E_{\infty\lambda} - k\, a\, E_\lambda \qquad (1)$$

E_λ = Extinktion zur Zeit t für die Wellenlänge λ , $E'_{o\lambda}$ = Extinktion zur Zeit t' für die Wellenlänge λ , $E_{\infty\lambda}$ = Extinktion zur Zeit $t = \infty$ für die Wellenlänge λ , k = Geschwindigkeitskonstante, a = Konzentration der Substanz A zur Zeit t' (wenn $t' = 0$, so ist $a = a_o$).
In den E_λ - $(E_\lambda - E'_{o\lambda}) / (t - t')$ - Diagrammen erhält man eine Reihe von parallelen Geraden für die einzelnen Wellenlängen, aber nur unter der Bedingung, dass die Anfangskonzentrationen von A und B gleich sind ($a_o = b_o$). Die Reaktion nimmt ihren Verlauf in Richtung der Ordinate E_λ . Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate E ergibt den Extinktionswert für vollständige Reaktion (100 % $E_{\infty\lambda}$).

Ein solches Diagramm zeigt die folgende Abbildung 8.

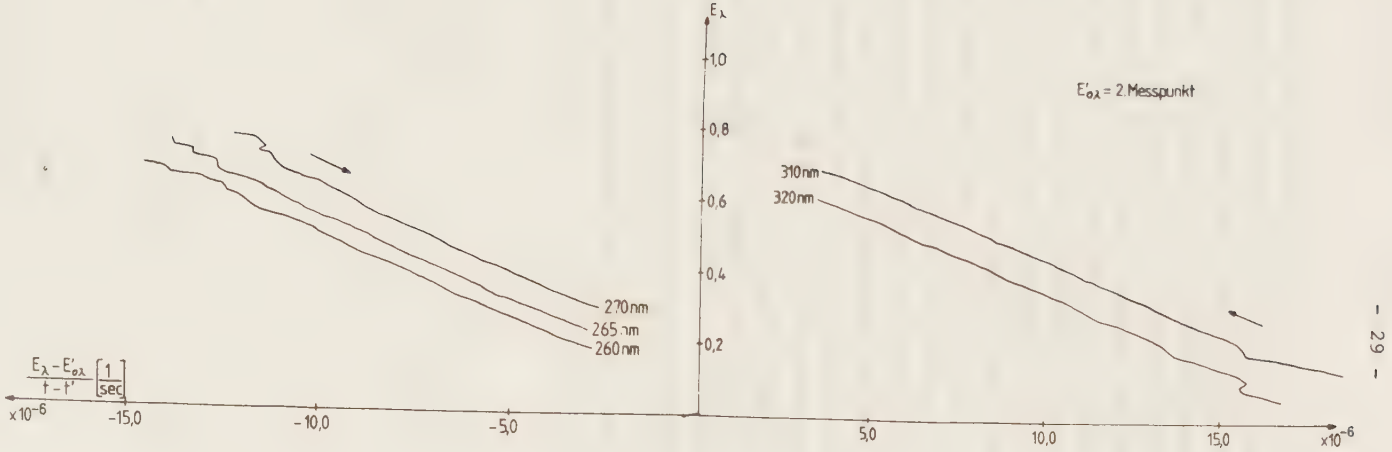


Abb. 8 $E_\lambda - (E_\lambda - E'_{o\lambda}) / (t - t')$ - Diagramm der Reaktion Gly-O-Et x HCl mit BOC-Ala-Leu-Gly-ONP und TEA bei den Wellenlängen 260, 265, 270, 310 und 320 nm. Alle Komponenten 10^{-3} molar in Acetronitril, 25°C.

Die Reaktion läuft in Richtung der Ordinate ab. Die Kurven für die Wellenlängen 310 und 320 nm liegen im rechten Quadranten des Koordinationssystems, die Kurven für 260, 265 und 270 nm im linken Quadranten. Die Kurven sind linear und die Geraden unabhängig von der Wellenlänge. Der unregelmässige Verlauf der Messpunkte zu Beginn der Reaktion deutet auf schwache Konkurrenzreaktionen hin, die aber bei zunehmender Reaktionsdauer unerheblich werden.
Im allgemeinen dauert es lange, bis die Reaktion mit gleichen Anfangskonzentrationen total abgelaufen ist. Mit Hilfe von Gleichung (1) lässt sich $E_{\infty\lambda}$ sehr genau und leicht bestimmen, auch wenn die Reaktion nur bis zu 80 % Umsatz verfolgt wurde. Die Messdaten werden mit Hilfe einer Grossrechenanlage verarbeitet. Das EDTQ-Programm berechnet k über Gleichung (1). Bei n Messdaten pro Wellenlänge können nacheinander (n - 5) Messwerte als $E'_{o\lambda}$ eingesetzt werden: jedes k im so entwickelten $E_\lambda - (E_\lambda - E'_{o\lambda}) / (t - t')$ - Diagramm wird über die Streuung dieser Ausgleichsgeraden mit einem Gewicht versehen und hierüber der wahrscheinlichste k-Wert berechnet (127). Die $E_{\infty\lambda}$-Werte werden entsprechend ermittelt.
Die folgende Abbildung 9 zeigt das entsprechende Diagramm aller vier gemessenen Reaktionen für die Wellenlänge 320 nm.

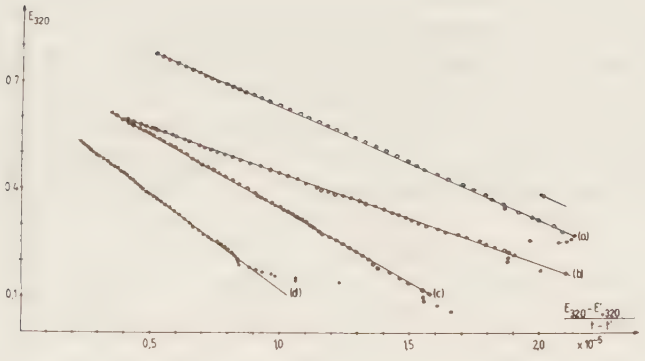


Abb. 9 (a) $(Gly)_3$-O-Et x HCl + BOC-Ala-Leu-Gly-ONP + TEA

(b) PEG-$(Gly)_3$ x HCl + BOC-Ala-Leu-Gly-ONP + TEA

(c) Gly-O-Et x HCl + BOC-Ala-Leu-Gly-ONP + TEA

(d) PEG-Gly x HCl + BOC-Ala-Leu-Gly-ONP + TEA

5.1.2. Die formale Integration

Zum Vergleich wurden die Geschwindigkeitskonstanten auch über die Methode der formalen Integration ermittelt. Benutzt man diese Methode, so können die Anfangskonzentrationen beider Reaktionspartner unterschiedlich sein. Mit Hilfe folgender Gleichung

$$\frac{\ln a/a_o}{t} = k\,(a_o - b_o) - \frac{a\,dt}{t} \qquad (2)$$

kann das "E-Diagramm" (128) in das -(ln a/a_o) / t - (a dt/t) - Diagramm übergeführt werden. Man erhält eine Gerade, aus

deren Steigung k ermittelt werden kann.
In Gleichung (2) sind a_o und b_o die Anfangskonzentrationen von A und B, a = Anfangskonzentration von A zur Zeit t, k = Geschwindigkeitskonstante in $[mol^{-1} sec^{-1}]$.
Das entsprechende Diagramm für die Reaktion Gly-O-Et x HCl mit BOC-Ala-Leu-Gly-ONP und TEA bei der Wellenlänge 320/310 nm zeigt Abbildung 10. Die Reaktion läuft in Richtung der Ordinate ab. Auch hier machen sich Konkurrenzreaktionen zu Beginn der Reaktion bemerkbar.

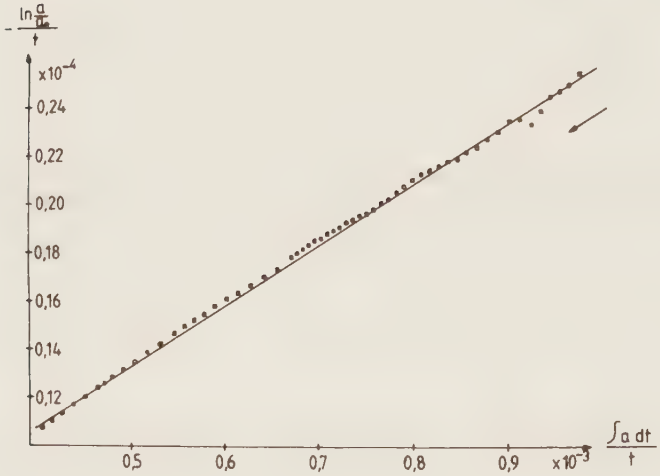


Abb. 10 $-(\ln a/a_o) / t - (a\,dt/t)$ - Diagramm für die Reaktion Gly-O-Et x HCl + BOC-Ala-Leu-Gly-ONP + TEA. Alle Komponenten 10^{-3} molar in Acetonitril bei 25°C.

5.2. Ergebnis der kinetischen Messungen

Die Mehrwellenlängenmessungen wurden am Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Doppelmonochromator MM12, Spaltautomatik und temperierbarem Küvettenhalter durchgeführt. Temperiert wurde mit einem Haake-Umwälzthermostaten FP. Die Temperatur im Küvetteninneren betrug immer 25,0 $\pm$ 0,2°C. Acetonitril und Triethylamin waren von höchster Reinheit. Die Konzentration aller Reaktionsteilnehmer war 10^{-3} molar. Wiederholt wurden die Extinktionen bei den Wellenlängen 260, 265, 270, 310 und 320 nm gemessen.
In der folgenden Tabelle sind die Geschwindigkeitskonstanten der gemessenen Reaktionen aufgeführt:

BOC-Ala-Leu-Gly-ONP + TEA	k $[mol^{-1}sec^{-1}]$ nach Gl. (1)	k $[mol^{-1}sec^{-1}]$ nach Gl. (2)
Gly-O-Et x HCl	$0,26 \cdot 10^{-1}$	$0,26 \cdot 10^{-1}$
$(Gly)_3$-O-Et x HCl	$0,40 \cdot 10^{-1}$	$0,38 \cdot 10^{-1}$

Die erhaltenen Werte stimmen mit den Ergebnissen weiterführender kinetischer Untersuchungen sehr gut überein (129).

5.3. Diskussion der Ergebnisse

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse sollen die Geschwindigkeitskonstanten aller gemessenen Reaktionen gegenübergestellt werden:

		k[$mol^{-1}sec^{-1}$] Gl.(1)	Gl.(2)		k[$mol^{-1}sec^{-1}$] Gl.(1)	Gl.(2)
PEG-O-Gly x HCl	+ BOC-Gly-ONP + TEA	$0,12\ 10^{-1}$	$0,14\ 10^{-1}$	+ BOC-Ala-Leu-Gly-ONP + TEA	$0,18\ 10^{-1}$	$0,20\ 10^{-1}$
PEG-O-$(Gly)_3$ x HCl	— // —	$0,32\ 10^{-1}$	$0,31\ 10^{-1}$	— // —	$0,40\ 10^{-1}$	$0,42\ 10^{-1}$
Gly-O-Et x HCl	— // —	$0,12\ 10^{-1}$	$0,13\ 10^{-1}$	— // —	$0,26\ 10^{-1}$	$0,24\ 10^{-1}$
$(Gly)_3$-O-Et x HCl	— // —	$0,19\ 10^{-1}$	$0,19\ 10^{-1}$	— // —	$0,40\ 10^{-1}$	$0,38\ 10^{-1}$

Überraschend ist, dass die Geschwindigkeitskonstanten der Fragmentkupplungen erheblich grösser sind als bei der normalen Aminosäurekupplung. Bei der Reaktion der PEG-Ester erhöhte sich die Geschwindigkeitskonstante um den Faktor 1,5, bei den Ethylestern um den Faktor 2. Der Grund dafür liegt ohne Zweifel am Tripeptid-ONP-Ester. Wahrscheinlich wird beim Tripeptid das positivierte Zentrum am aktivierten Carboxyl-C-Atom durch intramolekulare Einflüsse verstärkt und so der nucleophile Angriff der freien Aminogruppe erleichtert. Dies kann durch H-Brückenbildung des Protons am aminoendständigen Stickstoffatom des Peptids mit dem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe geschehen. Diese Wechselwirkung tritt auf, wenn sich die beiden Atome bis auf ca. 2 Å nähern können, was bei dem in Abb. 11 wiedergegebenen 10-Turn (130) durchaus der Fall sein kann.

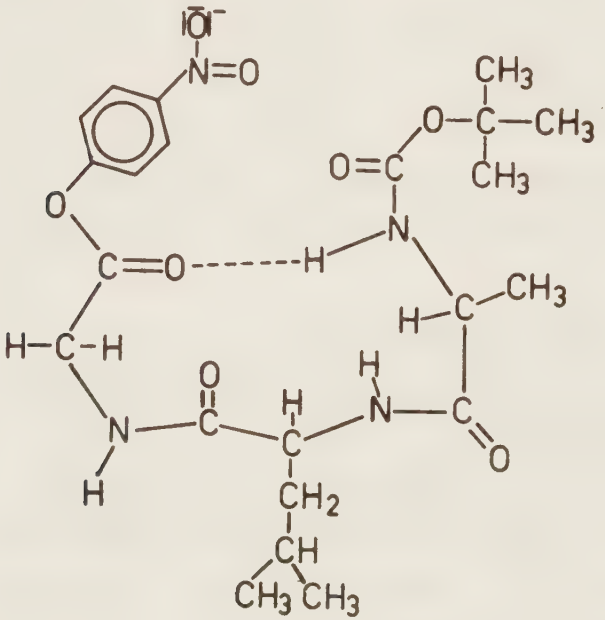


Abb. 11 ß-Turn von BOC-Ala-Leu-Gly-ONP

Die Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten ist bei den PEG-Estern nur halb so gross wie bei den Ethylestern. Dadurch liegen die Geschwindigkeitskonstanten in der gleichen Grössenordnung. Der beschleunigende Effekt bei der Reaktion von Polyethylenglykol-Estern mit BOC-Gly-ONP wurde bei der Fragmentkupplung nicht mehr beobachtet. Dies zeigt, dass die Molekülgrösse der Polyethylenglykol-Ester keinen Einfluss auf die Kinetik der Reaktion hat.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

1.1. Verzeichnis der Abkürzungen

AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureanalyse
$A(SSO_3^-)_4$	Tetrathiosulfat-A-Kette
BOC	t-Butyloxycarbonyl-
$B(SSO_3^-)_2$	Bisthiosulfat-B-Kette
BuOH	n-Butanol
Bzl	Benzyl-
CH_2Cl_2	Methylenchlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	Dicyclocarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
GC	Gaschromatographie
HAc	Essigsäure
IR	Infrarot
LPM	Liquid-Phase-Methode
Mbh	4,4'-Dimethoxybenzhydryl
MBS	Methoxybenzolsulfon-
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mM	Millimol
NMM	N-Methylmorpholin
PEG	Polyethylenglykol
Pd/C	Palladium/Aktivkohle
SIP	S-Isopropyl-
Std.	Stunden
RT	Raumtemperatur

TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett
Z	Benzyloxycarbonyl-

Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den IUPAC-Regeln.

1.2. Geräte und Instrumente

Mikrodosimat mit pH-Meter E 512, Impulsomat E 473 der Firma Metrohm, Schweiz

Schmelzpunktsbestimmungsapparatur nach D. Tottoli der Firma Büchi, Schweiz

UV-Lampe UVIS von Desaga für 254/366 nm und Tageslicht-visualisation

Aminosäureanalysator Beckmann Unichrom und Multichrom, sowie Biotronik LC 6000

Registrierender Spektralphotometer DMR 21 WL der Firma Zeiss mit temperierbarem Küvettenhalter

Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Doppelmonochromator MM 12, Spaltautomatik und temperierbarem Küvettenhalter

Fraktionssammler LKB 7000 Ultrorac mit optischer Einheit Uvicord I und Uvicord III

Fraktionssammler mit optischer Einheit UA 5 ISCO

IR-Spektroskopie: Perkin-Elmer Infracord

^{13}C-NMR: Bruker WP 80

Visking Dialysierschlauch 20/32

Dünnschichtelektrophoreseapparatur der Firma Camag

1.3. Lösungsmittel und Chemikalien

Methylenchlorid wird über Kaliumcarbonat destilliert.
Diethylether wird mit Natrium-Dispersion in Paraffin absolutiert und destilliert.
DMF: 250 g DMF werden mit 30 g Benzol und 12 g Wasser versetzt und unter Lichtausschluss destilliert.
Essigsäure wird mit P_4O_{10} vorgetrocknet und anschliessend destilliert.
DCCI wird im Hochvakuum destilliert und als 2 m Lösung in Methylenchlorid eingesetzt.
1,2 n HCl/Eisessig bildet sich beim Einleiten von HCl-Gas in 1000 g Essigsäure. Dabei nimmt das Gewicht um 42,0 g zu.
Acetronitril, Uvasol Merck, wurde drei mal mit Molekularsieb 3 Å behandelt und dann destilliert.
Ethanol: In 1000 ml käuflichem, absolutem Ethanol werden 7,0 g Natrium gelöst, 27,5 g Phtalsäurediethylester zugegeben und eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Dann wird destilliert.
Triethylamin wird über eine Drehbandkolonne destilliert.
Das PEG stammt von der Firma Roth. Es wird vor Gebrauch zwei mal mit Ether aus Methylenchlorid umgefällt und am Hochvakuum getrocknet.
Die verwendeten L-Aminosäuren wurden von der Firma Merck, Darmstadt, geliefert.
DC-Platten Kieselgel 60 mit und ohne Flureszensindikator wurden ebenfalls von der Firma Merck bezogen.
Fluram wurde bei Hofmann La Roche gekauft.
Sephadex LH 20 stammte von Pharmacia.
Trifluoressigsäure wurde unter Zusatz von etwas konzentrierter Schwefelsäure destilliert.

1.4. Allgemeine Arbeitsvorschriften

1.4.1. Aminosäureanalysen

Die Proben wurden, sofern nicht anders angegeben, wie folgt vorbereitet:
Etwa 1 Mikromol Peptid oder Polymerpeptid wurden in eine Glasampulle genau eingewogen und mit 3 ml 6 n HCl versetzt. Bei schwer löslichen Polymerpeptiden wurden 0,5 ml TFA zugegeben. Die Lösung wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Ampulle am Hochvakuum zugeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgte bei 110°C während 24 Stunden.
Anschliessend wird die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.
Der Rückstand wird nach Spackman et al. (131) analysiert.

1.4.2. Racemisierungstest

Die Prüfung auf Racematanteile erfolgt gaschromatographisch (120). Dazu werden die Proben wie für die Aminosäureanalyse vorbereitet. Das trockene Hydrolysat wird in 0,5 ml 1,2 n HCl/Isopropanol aufgenommen und eine Stunde bei 110°C verestert. Das Lösungsmittel wird mit Stickstoff abgeblasen. Die Acylierung der Aminogruppe wird mit 100 Mikroliter Pentafluorpropionsäureanhydrid in 0,5 ml Methylenchlorid während 10 min bei 110°C durchgeführt. Das Lösungsmittel wird mit Stickstoff vollständig abgeblasen. In einer Glaskapillarsäule, die mit Chirasil-Val beschichtet ist, werden die nunmehr flüchtigen Aminosäurederivate in ihre Enantiomeren aufgetrennt und quantitativ erfasst.

1.4.3. Dünnschichtchromatographie

Folgende Laufmittel wurden eingesetzt:

A Butanol/Eisessig/Wasser 3 : 1 : 1 (BAW)

B Chloroform/Methanol 7 : 3

C Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin 15 : 3 : 12 : 10

Folgende Anfärbereagentien wurden verwendet:

Ninhydrinlösung (132,133):
Eine Mischung aus 200 ml n-Butanol, 6 ml Eisessig und 0,6 g Ninhydrin.
Das Chromatogramm wird mit dieser Lösung besprüht. Bei 100°C ergeben freie wie auch BOC-geschützte Aminogruppen nach 10 min eine rot-violette Färbung.

Chlor/Tolidin-Test (134,135):
80 mg o-Tolidin, 15 ml Eisessig und 0,5 g KJ werden mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Das getrocknete Chromatogramm wird mit Wasserdampf benetzt und mit elementarem Chlor 10 min lang chloriert. Nach Belüften wird die Platte mit dem Reagens besprüht. Gelbe Flecken zeigen eine Peptidbindung an.

Fluram-Test (58):
Eine 0,05 %ige Lösung von Fluram-Roche in Aceton.
Das getrocknete Chromatogramm wird mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung besprüht, anschliessend mit Reagens. Freie primäre Aminogruppen zeigen bei 366 nm eine konzentrationsabhängige Flureszenz.

Dragendorff-Bürger-Reagens (136,137):
a) 1,7 g basisches Wismutnitrat werden in 20 ml Eisessig gelöst. Nach Zusatz von 80 ml Wasser, einer Lösung von 40 g KJ in 100 ml Wasser und 200 ml Eisessig wird mit Wasser auf 1000 ml verdünnt.
b) Bariumchloridlösung (20 % in Wasser)

Vor Gebrauch werden 2 Vol. a) mit 1 Vol b) gemischt. PEG ergibt mit dem Reagens nach Besprühen eine intensive Gelbfärbung.

2. Darstellung der Ausgangsverbindungen

2.1. Darstellung der Aminosäurederivate

BOC-Azid wurde nach L. Carpino (138) hergestellt. Folgende BOC-Aminosäuren wurden nach der pH-Stat-Methode von E. Schnabel (139) hergestellt:
BOC-Ala, BOC-Gln(NH_2)-OH, BOC-Glu(Bzl)-OH, BOC-Gly, BOC-Leu, BOC-Lys(Z)-OH, BOC-Phe, BOC-Pro, BOC-Ser(Bzl)-OH, BOC-Tyr(Bzl)-OH und BOC-Val.
Von den trifunktionellen Aminosäuren wurden folgende Derivate hergestellt:
H-Asn(Mbh)-OH (94), H-Cys(SiP)-OH (96), H-Glu(OBzl)-OH (140), H-Lys(Z)-OH (141), H-Thr(Bzl)-OH (142), H-Tyr(Bzl)-OH (143).
Weiterhin wurden synthetisiert:
BOC-Asn(Mbh)-OH (144), BOC-Cys(SiP)-OH (96), BOC-Thr(Bzl)-OH (142) und Di-BOC-His (145).

Alle eingesetzten Aminosäurederivate wurden einer dünnschichtchromatographischen Reinheitskontrolle unterzogen. Die Schmelzpunkte und Drehwerte der synthetisierten Verbindungen stimmten mit den Literaturangaben überein.

2.2. Darstellung von BOC-Arg(MBS)-OH

Z-Arg(NH_2)-OH wurde käuflich erworben. Die Umsetzung mit Methoxybenzolsulfochlorid erfolgte nach (146).

a) H-Arg(MBS)-OH

36,3 g (78 mM) Z-Arg(MBS)-OH werden in 300 ml Methanol gelöst und 20 ml Essigsäure sowie 1,0 g Pd/C zugefügt. Dann wird in einer Schüttelapparatur 8 Std. lang hydriert, vom Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Umkristallisiert wurde aus Wasser.
Ausbeute: 13,5 g ≙ 48,2 % d.Th.
Schmelzpunkt: 145-147°C

Elementaranalyse: $C_{13}H_{20}O_5N_4S \times 0{,}5\ H_2O$ MG 353,4

Ber.:	C	44,19	H	5,95	N	15,86	S	9,06
Gef.:	C	44,96	H	6,16	N	16,03	S	9,29

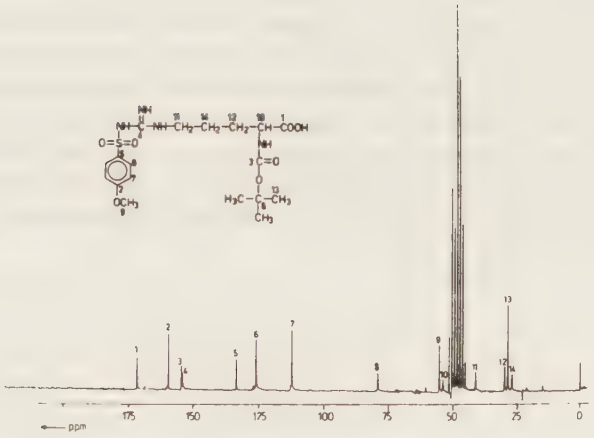
b) BOC-Arg(MBS)-OH

14,0 g (40,7 mM) H-Arg(MBS)-OH werden in 40 ml Dioxan suspendiert und nach Zugabe von 20 ml Wasser mit 15,0 g (0,1 Mol) BOC-Azid versetzt. Dann wird am pH-Stat bei pH 9,8 mit 4 n NaOH titriert. Nach 12 Std. war die Reaktion beendet. Zur Entfernung von überschüssigem BOC-Azid wird zweimal mit Ether extrahiert. Anschliessend wird mit Citronensäure auf pH 3 angesäuert und die freie BOC-Aminosäure mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Aus der filtrierten und eingeengten Lösung wird das Produkt mit Petrolether (30/50) kristallisiert.
Ausbeute: 14,5 g ≙ 82 % d.Th.
Schmelupunkt: 84-87°C
R_f: 0,525 (A)

Elementaranalyse: $C_{18}H_{28}N_4O_7S$ MG 444,5

Ber.:	C	48,64	H	6,35	N	12,61	S	7,21
Gef.:	C	48,87	H	6,24	N	12,05	S	7,27

^{13}C-NMR (CD_3OD)



δ-Werte (ppm): 1 = 176,77, 2 = 164,48, 3 = 159,30
4 = 158,85, 5 = 137,57, 6 = 129,83
7 = 115,72, 8 = 81,41, 9 = 56,89
10 = 55,41, 11 = 42,38, 12 = 30,78
13 = 29,53, 14 = 27,76

3. Darstellung von $(Gly)_3$-O-Et x HCl

3.1. BOC-Gly-Gly-O-Et

27,5 g (0,16 Mol) BOC-Gly werden in DMF gelöst und auf -15°C gekühlt. 20,4 g (0,15 Mol) Chlorameisensäureisobutylester werden langsam zugetropft, anschliessend 16,2 g (0,16 Mol) NMM. Die Temperatur übersteigt niemals -15°C.

Nach 30 min Rühren werden 14,0 g (0,1 Mol) Gly-O-Et x HCl und 10,2 g (0,1 Mol) NMM zugegeben und bei -15°C 2 Std. lang gerührt.
Das überschüssige gemischte Anhydrid wird mit gesättigter $KHCO_3$-Lösung bei 0°C hydrolysiert. Dabei steigt der pH auf 8. Nach Zugabe von 400 ml 5,6 m NaCl-Lösung wird einige Zeit gekühlt. Da das Peptid nicht ausfällt, wird dreimal mit Essigester extrahiert, die organische Phase mit NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Trockenmittel wird abfiltriert und das Produkt nach Einengen des Lösungsmittels mit Petrolether (60/90) kristallisiert.
Ausbeute: 20,0 g $\hat{=}$ 77 % d.Th.
R_f: 0,71 (C), 0,50 (A)

Elementaranalyse: $C_{11}H_{20}N_2O_5$ MG 260

Ber.	C	50,77	H	7,69	N 10,77
GEf.:	C	50,66	H	7,84	N 10,75

3.2. H-Gly-Gly-O-Et x HCl

13,0 g (50 mM) BOC-Gly-Gly-O-Et werden in 130 ml 1,2 n HCl/HAc gelöst und 20 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Zur Entfernung letzter Reste von Essigsäure wird 24 Std. am Hochvakuum getrocknet. Erhalten werden 9,8 g (50 mM) H-Gly-Gly-O-Et x HCl, die ohne weitere Reinigung weiterverwendet werden.
R_f: 0,46 (C)

3.3. BOC-Gly-Gly-Gly-O-Et

13,1 g (75 mM) BOC-Gly werden in DMF gelöst, auf -15°C abgekühlt und 10,3 g (75 mM) Chlorameisensäureisobutylester sowie 7,6 g (75 mM) NMM langsam zugetropft. Nach

20 min Rühren bei -15°C hat sich das gemischte Anhydrid gebildet.
Zur Reaktionslösung werden 9,8 g (50 mM) H-Gly-Gly-O-Et x HCl gegeben, anschliessend werden 5,1 g (50 mM) NMM langsam zugetropft. Dann wird 2 Stdn. bei -15°C gerührt.
Hydrolysiert wird mit gesättigter $KHCO_3$-Lösung bei 0°C. Nach Versetzten mit 5,6 m NaCl-Lösung wird das Peptid mit Essigester extrahiert, die organische Phase mehrmals mit NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Trockenmittel wird abfiltriert und das Produkt nach Einengen des Lösungsmittels mit Petrolether (30/50) kristallisiert.
Ausbeute: 9,4 g ≙ 59,2 % d.Th.
R_f: 0,74 (C), 0,48 (A)

Elementaranalyse: $C_{13}H_{23}N_3O_6$ MG 317

Ber.:	C	49,21	H	7,26	N	13,25	
Gef.:	C	48,93	H	7,36	N	12,93	

3.4. H-Gly-Gly-Gly-O-Et x HCl

4,8 g (15 mM) BOC-Gly-Gly-Gly-O-Et werden in 50 ml 1,2 n HCl/Eisessig gelöst und 20 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird bis zur Trockne abgezogen und das Produkt über P_4O_{10} im Hochvakuum belassen. Die erhaltene ölige Substanz kristallisiert nach Verreiben mit Ether aus. Umkristallisiert wird aus Ethanol/Ether.
Ausbeute: 2,9 g ≙ 78 % d.Th.
R_f: 0,08 (A)

Elementaranalyse: $C_8H_{16}N_3O_4Cl$ MG 253,5

Ber.:	C	37,87	H	6,31	N	16,57	Cl	14,00
Gef.:	C	37,53	H	6,37	N	16,13	Cl	13,40

4. Darstellung von BOC-Ala-Leu-Gly-ONP

Gly-O-Me x HCl wird analog (147) hergestellt.

4.1. BOC-Leu-Gly-OMe

38,2 g (0,16 Mol) BOC-Leu x 0,5 H_2O werden 48 Stdn. über P_4O_{10} im Hochvakuum getrocknet. Dann wird in frisch destilliertem DMF gelöst, auf -15°C abgekühlt und 20,4 g (0,15 Mol) Chlorameisensäureisobutylester sowie 15,1 g (0,15 Mol) NMM zugegeben. Nach 20 min hat sich das gemischte Anhydrid gebildet.
Zum Reaktionsgemisch werden nun 19,5 g (0,15 Mol) Gly-O-Me x HCl und 15,1 g (0,15 Mol) NMM zugegeben und bei -15°C 3 Stdn. lang gerührt. Anschliessend wird mit gesättigter $KHCO_3$-Lösung neutralisiert. Das Dipeptid fällt direkt aus. Zur quantitativen Fällung wurde noch gesättigte NaCl-Lösung zugegeben, abfiltriert und zwei Mal mit 5,6 m NaCl-Lösung, sowie drei Mal mit Wasser gewaschen. Getrocknet wird über P_4O_{10} im Hochvakuum.
Erhalten werden 32,6 g Produkt, die ungereinigt zur weiteren Synthese eingesetzt werden.

4.2. H-Leu-Gly-O-Me x TFA

15,0 g (0,05 Mol) BOC-Leu-Gly-O-Me werden in 150 ml TFA/CH_2Cl_2 (1:1) gelöst und 20 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Produkt 24 Stdn. über P_4O_{10} im Hochvakuum getrocknet.
Erhalten werden 15,3 g (0,05 Mol) H-Leu-Gly-O-Me x TFA, die direkt weiterverwendet werden.

4.3. BOC-Ala-Leu-Gly-O-Me

15,03 g (75 mM) BOC-Ala werden in DMF gelöst, auf -15°C abgekühlt und 10,3 g (75 mM) Chlorameisensäureisobutylester sowie 7,6 g (75 mM) NMM zugegeben und 20 min gerührt.
15,3 g (50 mM) H-Leu-Gly-O-Me x TFA und 5,1 g (50 mM) NMM werden zu der Lösung des gemischten Anhydrids zugegeben und 3 Stdn. bei -15°C gerührt. Dann wird bei 0°C mit gesättigter $KHCO_3$-Lösung der pH auf 8 gebracht und das Peptid mit 5,6 m NaCl-Lösung ausgefällt, abfiltriert, zwei Mal mit NaCl-Lösung und fünf Mal mit Wasser gewaschen. Getrocknet wird über P_4O_{10} im Hochvakuum.
Greinigt wird durch Gelchromatographie (Sephadex LH 20, Laufmittel Methanol).
Ausbeute: 6,2 g ≙ 33 % d.Th.
R_f: 0,85 (B)
ASA: Ala : Leu : Gly = 1,00 : 1,02 : 0,98

Elementaranalyse: $C_{17}H_{31}N_3O_6$ MG 373

Ber.:	C	53,40	H	8,10	N 11,70
Gef.:	C	53,52	H	8,21	N 11,53

4.4. BOC-Ala-Leu-Gly-OH

3,0 g (8,3 mM) BOC-Ala-Leu-Gly-O-Me werden in 20 ml Dioxan/Wasser (1:1) aufgeschlämmt und am pH-Stat mit 0,2 n NaOH bei pH 10,5 verseift. Nach 5 Stdn. ist die Reaktion beendet. Mit 0,2 n Essigsäure wird auf pH 3 gebracht und das freie Tripeptid mit Essigester extrahiert. Getrocknet wird über Na_2SO_4, abfiltriert und bis zur Trockne abgezogen. Dann wurde in Wasser aufgeschlämmt und lyophilisiert.
Ausbeute: 2,3 g ≙ 79 % d.Th.
R_f: 0,61 (B)

4.5. BOC-Ala-Leu-Gly-ONP

2,3 g (6,6 mM) BOC-Ala-Leu-Gly-OH und 1,15 g (8,0 mM) p-Nitrophenol werden in 300 ml Essigester gelöst, auf $0^{\circ}C$ abgekühlt und mit einer Lösung von 1,36 g (6,6 mM) DCCI in 2 ml Essigester versetzt. Nach 3 Stdn. bei $0^{\circ}C$ wurde noch 12 Stdn. bei RT gerührt, von Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und die organische Phase sechs Mal mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Getrocknet wird über Na_2SO_4, dann filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Umkristallisiert wird aus Essigester/Petrolether (30/50).

Ausbeute: 2,5 g ≙ 71 % d.Th.

R_f: 0,86 (B)

Elementaranalyse: $C_{22}H_{32}N_4O_8$ MG 482

Ber.:	C	54,99	H	6,71	N 11,66
Gef.:	C	55,28	H	6,95	N 11,42

5. Synthese der B-Kette des Humaninsulins

5.1. Vorbereitung des Polymers und Fixierung der C-terminalen Aminosäure

5.1.1. Veresterung von BOC-Gly mit $PEG_{20\,000}$

8,4 g (48 mM) BOC-Gly werden in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst und 12 ml 2 m DCCI-Lösung (24 mM) zugetropft. Es wird 30 min lang bei $0^{\circ}C$ und weitere 30 min bei RT gerührt. Der entstandene Dicyclohexylharnstoff wird über eine Glasfritte G-3 abgesaugt und die klare Lösung von BOC-Gly-Anhydrid in eine Lösung von 80 g(8 mM) $PEG_{20\,000}$ in 300 ml CH_2Cl_2 gegeben. Nach Zugabe von 10 ml Pyridin als Katalysator

wird die Lösung 24 Stdn. bei RT gerührt. Danach wird die oben beschriebene Zugabe von BOC-Gly-Anhydrid in der gleichen Menge wiederholt, da erfahrungsgemäss bei der Erstreaktion die Veresterung nur zu etwa 80 % erfolgt. Es wird weitere 24 Stdn. bei RT gerührt. Dann wird mit Diethylether ausgefällt. Die Fällung wird zweimal aus CH_2Cl_2/Ether wiederholt. Überschüsse sind dann dünnschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar.

Die Aminosäureanalyse ergab eine Beladung von 95 %.

5.1.2. Abspaltung der Schutzgruppe

30 g (3 mM) BOC-Gly-PEG_{20} werden in 1,2 n HCl/HAc gelöst und 20 min bei RT gerührt. Am Rotationsverdampfer werden HCl sowie Lösungsmittel weitgehend abgezogen. Der verbleibende ölige Rückstand wird bei 0°C in CH_2Cl_2 gelöst und mit Ether gefällt. Umgefällt wird aus CH_2Cl_2/Ether.

5.1.3. Einführung der Ankergruppe

6,5 g (30 mM) p-Brommethylbenzoesäure werden in 50 ml DMF gelöst und 7,5 ml 2 m DCCI-Lösung (15 mM) zugegeben. Die Lösung wird 1 Stdn. bei RT gerührt. Danach wird über eine Glasfritte vom ausgefallenen DC-Harnstoff abfiltriert und zu einer Lösung von 30 g (3 mM) PEG_{20}-Gly x HCl in 200 ml DMF gegeben. Neutralisiert wird mit 1 ml NMM. Dann wird fünf Tage unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Das Polymer wird mit Ether ausgefällt und zweimal aus DMF/Ether umgefällt. Nach Fluram- und Ninhydrintest war der Umsatz nicht vollständig. Deshalb wurde die Reaktion mit dem gleichen, oben beschriebenen Ansatz wiederholt. Nach drei Tagen konnten mit Fluram keine freien Aminogruppen mehr festgestellt werden. Nach Ausfällen mit Ether, drei-

maligem Umfällen aus DMF/Ether und einmaligem Umkristallisieren aus Ethanol war das Produkt dünnschichtchromatographisch rein.

5.1.4. Veresterung der carboxylendständigen Aminosäure

4,4 g (10 mM) BOC-Thr(OBzl)-Cäsiumsalz werden in möglichst wenig DMF gelöst und zu einer Lösung von 30 g (3 mM) PEG_{20}-Gly-Anker in 200 ml DMF gegeben. Es wird 7 Tage bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Dann wird mit Ether ausgefällt. Zur Entfernung des entstandenen Cäsiumbromids sowie unverbrauchten BOC-Thr(OBzl)-Cäsiumsalzes wird in CH_2Cl_2 aufgenommen und die unlöslichen Salze abzentrifugiert. Dann wird mit Ether ausgefällt und einmal aus CH_2Cl_2/Ether umgefällt.
Nach Aminosäureanalyse ergab sich eine Beladung an Threonin von 50 %. Diese Beladung konnte trotz wiederholtem Umsatz mit BOC-Thr(OBzl)-Cäsiumsalz nicht gesteigert werden. Daraus ergibt sich, dass an die eingesetzten 30 g Polymer 1,5 mM kupplungsfähige Aminosäurekomponente gebunden sind.
Die Schutzgruppe wird analog 5.1.2. abgespalten.

5.2. Synthese des Peptids

Die Arbeitsschritte bei jeder Stufe zur Synthese des Peptids sind im Prinzip immer gleich. Es ergeben sich je nach eingesetztem Aminosäurederivat Abweichungen in der Wahl des Lösungsmittels, in dem voraktiviert wird. Ebenso können sich Kupplungs- und Abspaltungsdauer ändern. Mit zunehmender Kettenlänge ändert sich die Löslichkeit, so dass auf andere Lösungsmittel übergegangen wird.
Im folgenden sind die Reaktionsschritte genau beschrieben.

Die einzelnen Stufen werden nur kurz skizziert und die wesentlichen Daten und stöchiometrischen Verhältnisse angegeben.

Darstellung der symmetrischen Anhydride (DA): Das geschützte Aminosäurederivat wird in CH_2Cl_2 oder THF gelöst und auf 0^oC abgekühlt. Die entsprechende Menge DCCI, gelöst in CH_2Cl_2 wird zugetropft. Nach 30 min Rühren bei 0^oC wird noch 30 min bei RT gerührt. Die voraktivierte Aminosäure wird über eine Glasfritte in die Lösung des Polymerpeptids in CH_2Cl_2, DMF bzw. DMSO eingesaugt. Dabei wird der ausgefallene DC-Harnstoff zurückgehalten.

Kupplung (K) : Zur Reaktionslösung werden immer 0,5 ml NMM gegeben. Ein Teil dieser Menge dient zur Freisetzung der Aminogruppe des Polymerpeptids, der Überschuss soll die bei der Reaktion freiwerdende Aminosäure neutralisieren. Es wird die jeweilige Kupplungsdauer angegeben. Als Reinigungsschritt folgt mehrmaliges Umfällen oder Umkristallisieren, anschliessend wird am Hochvakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Umsatztest (UT): Das Ende der Reaktion wird mit Hilfe des Fluramtests oder des Ninhydrintests festgestellt.

Aminosäureanalyse (ASA) : Nach jeder Kupplung wurde vom gereinigten Produkt eine Probe entnommen, analog II. 1.4.1. vorbereitet und zur Amino-

säureanalyse gegeben. Phenol wurde nicht zugegeben. Ab B_{30-11} wurde zur 6 n HCl etwas TFA zugegeben, da sonst das Peptid nicht mehr vollständig hydrolysiert wurde. Die zuletzt gekuppelte Aminosäure wird durch Unterstreichen verdeutlicht.

Abspaltung der BOC-Gruppe : Eine ca. 10 %ige Lösung des Polymer-Peptids in 1,2 n HCl/HAc wird hergestellt. Bei zunehmender Kettenlänge muss wegen Löslichkeitsproblemen auf TFA übergegangen werden. Die Abspaltungsdauer richtet sich nach der Löslichkeit und beträgt immer 20 min, nachdem das Polymerpeptid vollständig in Lösung gegangen ist. Anschliessend wird das Lösungsmittel abgezogen, bei $0^{o}C$ in CH_2Cl_2, DMF oder DMSO aufgenommen und mit Ether ausgefällt. Es wird einmal umgefällt und am Hochvakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Ausbeute: Bei jedem Filtrationsschritt bleiben kleine Substanzmengen in der Glasfritte oder dem Reaktionsgefäss zurück. Dies führt zu einem steten Verlust während der Synthese.

5.2.1. B_{30-29}

DA: 6,7 g (18 mM) BOC-Lys(Z)-OH in CH_2Cl_2 und 4,5 ml 2 m DCCI-Lösung

K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x

UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Gly	Lys
Gef.:	0,84	2,30	1,00
theor.:	1	2	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 20 min
Ausbeute: 28,3 g

5.2.2. B_{30-28}

DA: 3,84 g (18 mM) BOC-Pro in CH_2Cl_2 und 4,5 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Pro	Gly	Lys
Gef.:	1,00	0,85	2,14	1,02
theor.:	1	1	2	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 20 min
Ausbeute: 28,0 g

5.2.3. B_{30-27}

DA: 3,09 g (10 mM) BOC-Thr(Bzl)-OH in CH_2Cl_2 und 2,5 ml DCCI-Lösung
K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Ninhydrin, besser als 98 %

ASA:	Thr	Pro	Gly	Lys
Gef.:	1,95	0,82	2,23	1,00
theor.:	2	1	2	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 20 min
Ausbeute: 27,8 g

5.2.4. B_{30-26}

DA: 4,5 g (12 mM) BOC-Thr(Bzl)-OH in CH_2Cl_2 und 3 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Pro	Gly	Tyr	Lys
Gef.:	2,00	0,71	2,00	0,66	0,82
theor.:	2	1	2	1	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 20 min
Ausbeute: 27,5 g

5.2.5. B_{30-25}

DA: 2,12 g (8 mM) BOC-Phe in CH_2Cl_2 und 2 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

Asa:	Thr	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys
Gef.:	1,60	0,85	2,09	0,68	1,00	0,70
theor.:	2	1	2	1	1	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 30 min
Ausbeute: 27,0 g

5.2.6. B_{30-24}

DA: 2,12 g (8 mM) BOC-Phe in CH_2Cl_2 und 2 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys
Gef.:	1,87	1,03	2,28	0,45	2,00	0,79
theor.:	2	1	2	1	2	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 30 min
Ausbeute: 26,7 g

5.2.7. B_{30-23}

DA: 1,4 g (8 mM) BOC-Gly in CH_2Cl_2 und 2 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys
Gef.:	1,75	0,83	3,37	0,64	2,00	0,65
theor.:	2	1	3	1	2	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 30 min
Ausbeute: 26,2 g

5.2.8. B_{30-22}

DA: 3,56 g (8 mM) BOC-Arg(MBS)-OH in CH_2Cl_2 und 2 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 5 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, noch starke Fluoreszenz

Nachkupplung:
DA: 1,78 g (4 mM) BOC-Arg(MBS)-OH in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether, DMF/Ether, Umkristallisieren aus Ethanol
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	1,80	0,88	3,33	0,83	2,00	0,86	1,16
theor.:	2	1	3	1	2	1	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 30 min
Ausbeute: 25,6 g

5.2.9. B_{30-21}

DA: 2,7 g (8 mM) BOC-Glu(OBzl)-OH in CH_2Cl_2 und 2 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	1,81	1,21	0,71	3,03	0,66	2,00	0,84	1,06
theor.:	2	1	1	3	1	2	1	1

Abspaltung: 1,2 m HCl/HAc, 40 min
Ausbeute: 25,4 g

Hier wurden 3,0 g Polymer-Peptid abgezweigt, um erste Eindrücke über den bisherigen Verlauf der Synthese zu erhalten. Es wurden zwei verschiedene Abspaltungsmethoden angewendet, die erhaltenen Produkte chromatographiert und identifiziert (siehe Kapitel 6.3.).

5.2.10. B_{30-20}

DA: 1,4 g (8 mM) BOC-Gly in CH_2Cl_2 und 2 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 2 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	2,00	1,25	0,92	4,45	0,53	1,90	0,84	1,00
theor.:	2	1	1	4	1	2	1	1

Abspaltung: TFA/CH_2Cl_2 (1:1), 30 min
Ausbeute: 21,8 g

5.2.11. B_{30-19}

DA: 0,9824 g (4 mM) BOC-Cys(SiP)-OH in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Cys	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	1,50	1,20	1,11	4,04	----	0,75	2,00	0,92	1,02
theor.:	2	1	1	4	1	1	2	1	1

Abspaltung: TFA, 30 min
Ausbeute: 21,4 g

5.2.12. B_{30-18}

DA: 0,87 g (4 mM) BOC-Val in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in CH_2Cl_2, RT, Umfällung: CH_2Cl_2/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Cys	Val	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	1,60	0,90	0,90	3,7	---	0,94	0,90	2,00	1,00	1,02
theor:	2	1	1	4	1	1	1	2	1	1

Abspaltung: TFA, 30 min
Ausbeute: 21,0 g

5.2.13. B_{30-17}

DA: 0,93 g (4 mM) BOC-Leu in CH_2Cl_2/THF und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Cys	Val	Leu	Tyr
Gef.:	1,34	0,72	0,52	3,59	---	0,71	0,97	0,62
theor.:	2	1	1	4	1	1	1	1

	Phe	Lys	Arg
Gef.:	2,00	0,71	0,93
theor:	2	1	1

Abspaltung: TFA, 30 min
Ausbeute: 20,8 g

5.2.14. B_{30-16}

DA: 1,5 g (4 mM) BOC-Tyr(Bzl)-OH in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Cys	Val	Leu	Tyr
Gef.:	1,50	0,71	0,65	---	---	0,91	0,98	1,57
theor.:	2	1	1	4	1	1	1	2

	Phe	Lys	Arg
Gef.:	2,00	0,58	1,01
theor.:	2	1	1

Abspaltung: TFA, 30 min
Ausbeute: 20,5 g

5.2.15. B_{30-15}

DA: 0,93 g (4 mM) BOC-Leu in CH_2Cl_2/THF und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung aus DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Cys	Val	Leu	Tyr
Gef.:	1,41	0,91	0,73	3,89	---	0,90	2,07	1,42
theor.:	2	1	1	4	1	1	2	2

	Phe	Lys	Arg
Gef.:	2,00	---	1,07
theor.:	2	1	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 20,0 g

5.2.16. B_{30-14}

DA: 0,76 g (4 mM) BOC-Ala in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Leu
Gef.:	1,24	0,81	0,94	4,09	1,00	---	0,81	2,20
theor.:	2	1	1	4	1	1	1	2

	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	1,36	1,99	0,65	1,02
theor.:	2	2	1	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 19,4 g

5.2.17. B_{30-13}

DA: 1,4 g (4 mM) BOC-Glu(OBzl)-OH in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Leu
Gef.:	1,65	1,78	0,91	3,78	0,96	---	0,97	2,00
theor.:	2	2	1	4	1	1	1	2

	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	1,30	1,94	0,73	1,21
theor.:	2	2	1	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 18,8 g

5.2.18. B_{30-12}

DA: 0,87 g (4 mM) BOC-Val in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/DMSO (1:1)/Ether
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Leu
Gef.:	1,95	1,83	1,03	3,66	0,92	---	1,97	2,00
theor.:	2	2	1	4	1	1	2	2

	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	0,66	1,72	1,18	1,19
theor.:	2	2	1	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 18,5 g

5.2.19. B_{30-11}

DA: 0,93 g (4 mM) BOC-Leu in CH_2Cl_2/THF und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF/DMSO (3:1), RT, Umfällung: DMF/DMSO (3:1)/Ether

UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Leu
Gef.:	2,08	1,80	---	3,53	0,70	---	2,06	3,00
theor.:	2	2	1	4	1	1	2	3

	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	0,67	1,75	0,99	1,20
theor.:	2	2	1	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 18,0 g

5.2.20. B_{30-10}

DA: 1,42 g (4 mM) Di-BOC-His in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 6 Stdn. in DMF/DMSO (3:1), RT,
Umfällung: DMF/DMSO (1:1)/Ether 2 x
UT: Fluram, Kupplung nicht vollständig

Nachkupplung:
DA: wie oben
K : 3 Stdn. in DMF/DMSO (3:1), RT,
Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Leu
Gef.:	1,85	1,64	0,90	3,71	0,94	---	2,00	3,12
theor.:	2	2	1	4	1	1	2	3

	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	0,68	1,83	0,84	0,63	1,18
theor.:	2	2	1	1	1

Abspaltung: TFA, 30 min
Ausbeute: 17,4 g

5.2.21. B_{30-9}

DA: 1,2 g (4 mM) BOC-Ser(Bzl)-OH in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Gef.:	1,85	1,22	2,06	0,85	4,09	0,99	---	2,00
theor.:	2	1	2	1	4	1	1	2

	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	3,20	0,59	1,89	0,72	0,52	1,14
theor.:	3	2	2	1	1	1

Abspaltung: TFA, 30 min
Ausbeute: 16,9 g

5.2.22. B_{30-8}

DA: 0,7 g (4 mM) BOC-Gly in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Gef.:	1,70	0,93	1,84	0,90	4,56	1,00	---	2,03
theor.:	2	1	2	1	5	1	1	2

	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	3,04	0,56	1,76	0,76	0,55	1,09
theor.:	3	2	2	1	1	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 16,3 g

5.2.23. B_{30-7}

LA: 0,98 g (4 mM) BOC-Cys(SiP)-OH in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Gef.:	1,81	0,69	1,95	---	4,67	1,00	---	2,01
theor.:	2	1	2	1	5	1	2	2

	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	3,12	0,51	1,83	0,83	0,61	1,10
theor.:	3	2	2	1	1	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 16,0 g

5.2.24. B_{30-6}

LA: 0,98 g (4 mM) BOC-Leu in CH_2Cl_2/THF und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Gef.:	1,74	0,76	1,83	0,86	4,44	1,00	---	2,00
theor.:	2	1	2	1	5	1	2	2

	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	3,80	0,54	1,72	0,71	0,51	1,17
theor.:	4	2	2	1	1	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 15,8 g

5.2.25. B_{30-5}

DA: 1,42 g (4 mM) Di-BOC-His in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 4 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, Kupplung nich vollständig

Nachkupplung:
DA: 0,72 g (2 mM) Di-BOC-His
K: 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Gef.:	1,65	0,71	2,06	---	4,56	1,00	---	1,84
theor.:	2	1	2	1	5	1	2	2

Gef.:	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	3,68	0,51	1,64	0,63	0,96	1,24
theor.:	4	2	2	1	2	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 15,5 g

5.2.26. B_{30-4}

DA: 0,99 g (4 mM) BOC-Glu(NH_2)-OH in THF und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Gef.:	1,66	0,65	2,35	0,78	4,35	1,00	---	1,89
theor.:	2	1	3	1	5	1	2	2

	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	3,50	0,44	1,82	0,66	0,95	1,19
theor.:	4	2	2	1	2	1

5.2.27. B_{30-3}

DA: 1,85 g (4 mM) BOC-Asp(MBH)-OH in THF und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 4 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, Kupplung nicht vollständig

Nachkupplung:
DA: wie oben
K : wie oben
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys
Gef.:	0,76	1,61	0,76	2,17	---	4,85	1,00	---
theor.:	1	2	1	2	1	5	1	2

	Val	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	1,96	3,93	0,36	1,77	0,68	0,97	1,11
theor.:	2	4	2	2	1	2	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 15,1 g

5.2.28. B_{30-2}

DA: 0,87 g)4 mM) BOC-Val in CH_2Cl_2 und 1 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 4 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, Kupplung nicht vollständig

Nachkupplung:
DA und K wie oben
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA:	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys
Gef.:	0,50	1,70	0,71	2,32	0,86	4,85	1,04	---
theor.:	1	2	1	3	1	5	1	2

	Val	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	2,43	4,00	0,41	1,84	0,70	0,99	1,18
theor.:	3	4	2	2	1	2	1

Abspaltung: TFA, 40 min
Ausbeute: 14,8 g

5.2.29. B_{30-1}

DA: 2,13 g (8 mM) BOC-Phe in CH_2Cl_2 und 2 ml 2 m DCCI-Lösung
K : 3 Stdn. in DMF, RT, Umfällung: DMF/Ether 2 x
UT: Fluram, besser als 99 %

ASA: (vor Hydrolyse ein Kristall Phenol zugegeben)

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys
Gef.:	0,41	1,99	0,69	2,58	0,91	4,93	1,08	0,49
theor.:	1	2	1	3	1	5	1	2

	Val	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	2,36	4,00	0,62	3,19	0,74	0,93	1,23
theor.:	3	4	2	3	1	2	1

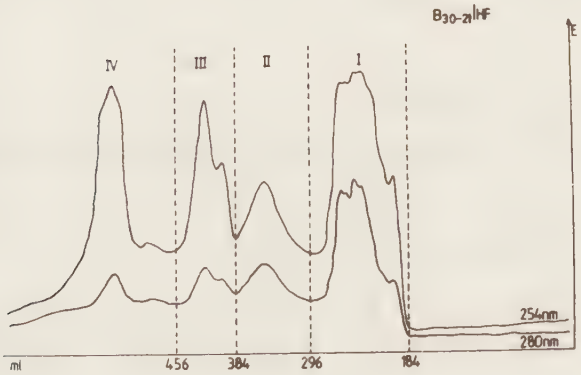
Ausbeute: 14,6 g

5.3. Aufarbeitung des Dekapeptids B_{30-21}

Während der Synthese der polymergebundenen Insulin B-Kette wurden auf der Stufe B_{30-21} (siehe Kapitel 5.2.9.) 3,0 g Substanz abgezweigt. Laut Aminosäureanalyse liegen in dieser Menge ca. 150 mg (0,15 mM) Dekapeptid polymergebunden vor.

5.3.1. Abspaltung mit HF

2,0 g (0,1 mM) Polymer-Peptid B_{30-21} werden bei -20°C nach Zugabe von 0,5 ml Anisol in 10 ml HF gelöst und 60 min bei dieser Temperatur gerührt. Das Kältebad wird entfernt und das HF bei RT mit N_2 abgeblasen. Dann wird 24 Stdn. am Hochvakuum über KOH stehen gelassen. Das Produkt wird in 25 ml DMF gelöst und in Portionen zu 5 ml auf eine Sephadex LH 20 - Säule (5 x 80 cm) gegeben. Es wird mit Methanol eluiert, Durchflussgeschwindigkeit 30 Tropfen/min. Die Extinktion wird bei 2 Wellenlängen, 254 und 280 nm, vermessen. Das Elutionsdiagramm zeigte folgendes Bild:



Es wurden 4 Fraktionen erhalten. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen, das erhaltene Produkt in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Fraktion I: PEG-Fraktion

Nach Aminosäureanalyse betrug die Beladung an Peptid nach der Behandlung mit HF noch 18 %. Die Synthese wurde mit einer Beladung von 50 % begonnen. Es konnten also 64 % des Peptids abgespalten werden.

Fraktion II: Peptidfraktion

Das Peptid ergab im Dünnschichtchromatogramm nur einen Fleck (Laufmittel C).

ASA

Hydrolyse: 6 n HCl, 110°C, 24 Stdn., Zusatz von einem Kristall Phenol

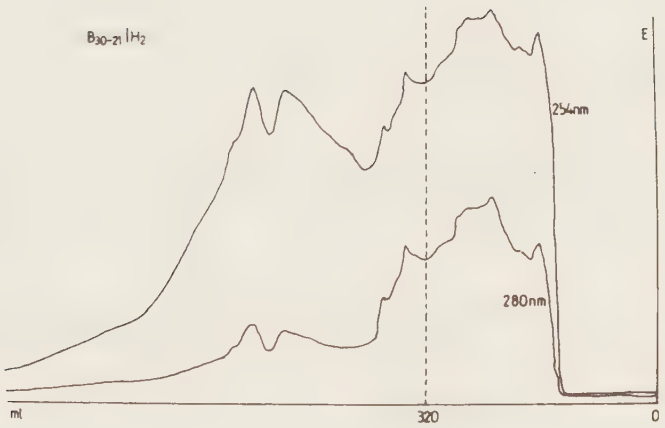
	Thr	Glu	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	2,13	0,82	1,06	1,00	0,61	2,14	0,87	0,89
theor.:	2	1	1	1	1	2	1	1

Fraktion III: Rumpfpeptide

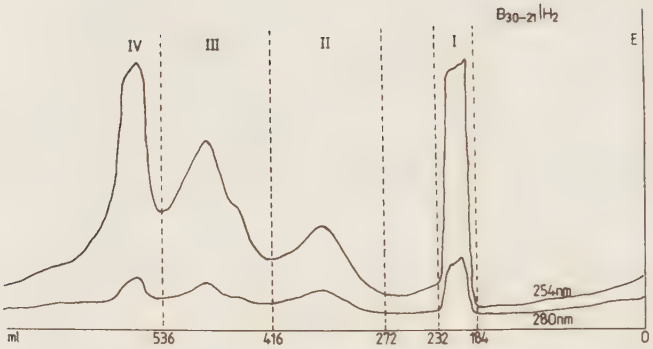
Fraktion IV: DMF, Anisol und abgespaltene Schutzgruppen

5.3.2. Hydrogenolytische Abspaltung

1,0 g (0,05 mM) Polymer-Peptid B_{30-21} wird in 40 ml MeOH/HAc (1:1) gelöst, 200 mg 10 %ige Pd-Kohle zugegeben und in einem Autoklaven bei einem Wasserstoffdruck von 60 bar unter Rühren 48 Stdn. lang hydriert. Die Aktivkohle wird abfiltriert, die Lösung eingeengt und auf eine Sephadex LH 20 - Säule (5 x 80 cm) gegeben. Eluiert wird mit MeOH. Das Elutionsdiagramm zeigt, dass die Säule überladen wurde.



Die erste Fraktion wurde geschnitten, so konnte der grösste Teil von PEG aus dem Reaktionsprodukt entfernt werden. Die restlichen Fraktionen werden vereinigt, das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt in 10 ml DMF gelöst. Es werden je 5 ml auf Sephadex LH 20 unter den gleichen Bedingungen wie oben chromatographiert. Das Elutionsdiagramm zeigt ein ähnliches Bild wie bei der HF-Abspaltung.



Fraktion I : PEG-Fraktion

Sie wurde mit der geschnittenen PEG-Fraktion der ersten Chromatographie vereinigt, das Lösungsmittel abgezogen, in Wasser gelöst und lyophilisiert.
Laut Aminosäureanalyse betrug die Beladung an Peptid nach der hydrogenolytischen Abspaltung noch 10 %. Die Synthese wurde mit einer Beladung von 50 % begonnen. Es konnten also 80 % des Peptids abgespalten werden.

Fraktion II: Peptidfraktion

Das Lösungsmittel wird abgezogen, das Produkt in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

Das Peptid ergab im Dünnschichtchromatogramm nur einen Fleck (Laufmittel C).

ASA

Hydrolyse: 6 n HCl, 110°C, 24 Stdn.,
Zusatz von einem Kristall Phenol

	Thr	Glu	Pro	Gly	Tyr	Phe	Lys	Arg
Gef.:	1,82	0,97	0,99	1,19	0,73	1,89	1,04	1,00
theor.:	2	1	1	1	1	2	1	1

Prüfung auf Racematanteile

Probenvorbereitung analog II. 1.4.2.

D-Anteile in %:

Thr	Pro	Phe	Glu	Tyr	Lys
0,97	1,20	1,49	1,51	3,70	0,94

Fraktion III: Rumpfpeptide

Fraktion IV: DMF, Anisol und abgespaltene Schutzgruppen

5.4. Aufarbeitung der polymergebundenen Insulin-B-Kette mit Fluorwasserstoff

5.4.1. Schutzgruppenabspaltung mit HF

2,0 g Polymerpeptid werden bei -20°C nach Zugabe von 0,2 ml Anisol in 20 ml HF gelöst und 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Das Kältebad wird durch ein Eisbad ersetzt, und die Lösung wird 60 min bei 0°C gerührt. Anschliessend wird das HF mit Stickstoff bei RT abgeblasen. Dann wird 24 Stdn. im Hochvakuum über KOH stehen gelassen.

5.4.2. Oxidative Sulfitolyse (112)

Das nach der HF-Behandlung erhaltene, ölige Substanzgemisch wird in 60 ml Phosphat-Harnstoff-Puffer (0,1 m NaH_2PO_4, 0,1 m Na_2HPO_4, 8 m Harnstoff) pH 7,5 aufgenommen. 1,4 g Na_2SO_3 und 1,4 g $Na_2S_4O_6$ werden in drei Portionen während 30 min zugegeben. Dann wird 15 Stdn. bei RT gerührt.
Die resultierende klare Lösung wird 6 Stdn. gegen 2 Liter Wasser bei stündlichem Wasserwechsel dialysiert und anschliessend gefriergetrocknet. Erhalten werden 1,6 g Substanzgemisch.

5.4.3. Ionenaustauschchromatographie (148)

Das erhaltene Substanzgemisch wird über einen Kationenaustauscher DOWEX 50 WX 2 aufgetrennt. Dazu wird eine Säule (20 x 2 cm) mit dem Austauscherharz gefüllt und mit einem Ameisensäure/Essigsäure/Harnstoff-Puffer pH 4 (5 Vol. % Ameisensäure, 5 Vol. % Essigsäure, 8 m Harnstoff) equilibriert. Der Säule wird ein Durchflussphotomester nachgeschaltet, gemssen wird die Absorption bei 254 nm.
800 mg des Substanzgemisches werden in 20 ml Puffer gelöst. Nach Auftragen auf die Säule wird solange eluiert, bis die Absorption wieder auf die Grundlinie abgesunken ist. Danach wird mit Wasser säurefrei gewaschen. Die Bis-Thiosulfat-B-Kette wird mit einem basischen Puffer mit pH 9,6 (0,2 m Na_2HPO_4, 8 m Harnstoff) eluiert.

Die zweiten 800 mg Substanzgemisch wurden analog chromatographiert.

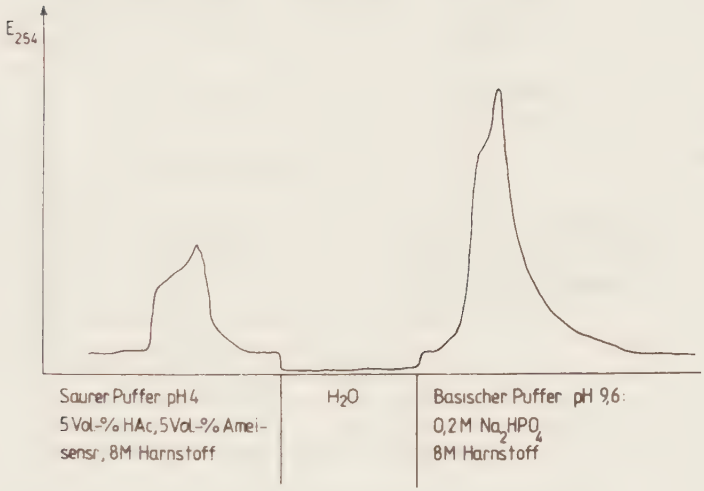


Abb. 12 Elutionsdiagramm der Ionenaustauschchromatographie

Die Eluate werden 6 Stdn. lang gegen 2 Liter Wasser bei stündlichem Wasserwechsel dialysiert und anschliessend gefriergetrocknet.

Erhalten wurden 10 mg Bis-Thiosulfat-B-Kette.

5.4.4. Charakterisierung des Produkts

Aminosäureanalyse

Hydrolyse: 6 n HCl, 110°C, 25 Stdn., Zusatz von einem Kristall Phenol

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys
Gef.:	0,62	1,68	1,05	2,65	0,95	3,74	1,15	0,31
theor.:	1	2	1	3	1	3	1	2

	Val	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
Gef.:	2,75	4,00	0,83	2,43	0,97	0,67	1,21
theor.:	3	4	2	3	1	2	1

Racemisierungstest (120)

Probenvorbereitung analog II. 1.4.2.

D-Anteile in %:

Ala	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Asp	Phe	Gly	Tyr
1,82	2,76	2,06	1,38	2,32	11,67	10,35	2,45	2,90	4,23

Lys
1,76

5.5. Abspaltung der polymergebundenen Insulin-B-Kette mit Natronlauge

5.5.1. Alkalische Hydrolyse der Peptid-Benzylester-Bindung

1,0 g Polymer-Peptid werden in 20 ml DMF gelöst. Es werden 20 ml 1 n NaOH zugegeben. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das entstehende, teilgeschützte B-Ketten-Derivat hat einen R_f-Wert von 0,34 (A). Die Reaktion ist nach 3 Stdn. beendet. Neutralisiert wird mit 1 n HCl und das entstandene NaCl durch Dialyse entfernt. Anschliessend wird lyophilisiert.

5.5.2. Schutzgruppenabspaltung mit Fluorwasserstoff

Der erhaltene Substanzgemisch wird bei -20°C in 10 ml HF gelöst. Das weitere Vorgehen geschieht analog II. 5.4.1.

5.5.3. Oxidative Sulfitolyse (112)

Die Substanz wird in 30 ml Phosphat/Harnstoff-Puffer pH 7,5 aufgenommen und 0,7 g Na_2SO_3 sowie 0,7 g $Na_2S_2O_6$ in drei Portionen während 30 min zugegeben. Das weitere Vorgehen geschieht analog II. 5.4.2.
Erhalten werden 780 mg Substanzgemisch.

5.5.4. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wird analog II. 5.4.3. durchgeführt. Nach Dialyse und Lyophilisation resultieren 30 mg synthetische Bis-Thiosulfat-B-Kette.

5.5.5. Charakterisierung des Produkts

Elementaranalyse

Das Molekulargewicht der Bis-thiosulfat-B-Kette beträgt 3594.

$C_{158}H_{238}N_{40}O_{48}S_4$

ber.:	C	52,80	H	6,27	N	15,60	S	3,60
gef.:	C	52,00	H	7,28	N	17,16	S	3,60

Aminosäureanalyse

Hydrolyse: 6 n HCl, 110°C, 24 Stdn., Zusatz von einem Kristall Phenol

Überführung von Cystein in Cysteinsäure (113):

Zu der nach der Hydrolyse erhaltenen, bis zur Trockne eingedampften Substanz werden 0,2 ml Ethanol und 0,4 ml frisch dargestellte Perameisensäure gegeben und 24 Stdn. bei 0°C stehen gelassen. Anschliessend wird bis zur Trockne eingedampft.

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys
$B_{syn.}$	0,45	1,66	0,86	2,81	0,91	3,34	1,26	0,63
$B_{nat.}$	1,06	0,86	1,08	3,02	0,98	3,36	2,38	0,84
theor.	1	2(1)	1	3	1	3	1(2)	2

	Val	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
$B_{syn.}$	2,33	4,00	0,79	2,54	1,07	0,69	1,18
$B_{nat.}$	2,98	4,00	1,89	3,00	1,21	1,90	1,29
theor.	3	4	2	3	1	2	1

Racemisierungstest (120)

Probenvorbereitung analog II. 1.4.2.

D-Anteile in %:

Ala	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Asp	Phe	Glu	Tyr
2,29	2,90	1,23	1,61	2,29	20,92	14,77	2,94	3,14	4,35

Lys
1,85

IR-Spektroskopie

Die Einwaage beträgt bei beiden Proben 1,5 mg/300 mg KBr.

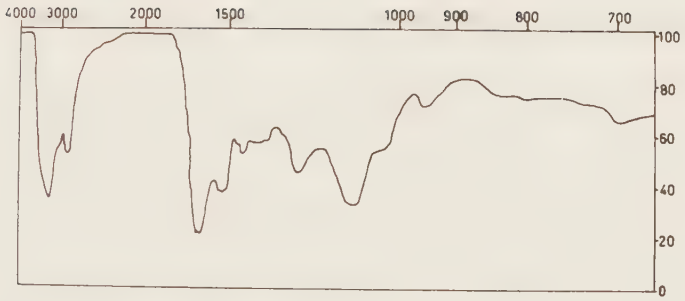


Abb. 13 IR-Spektrum von synthetischer Bis-thiosulfat-B-Kette

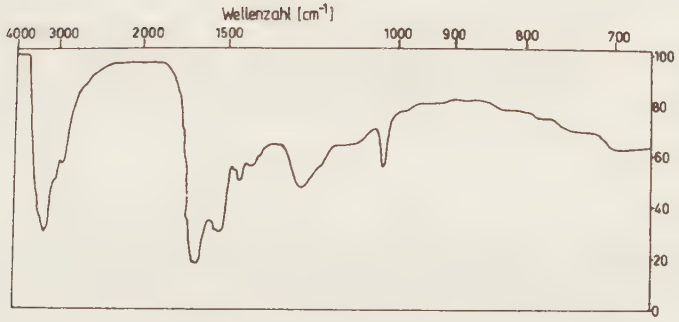


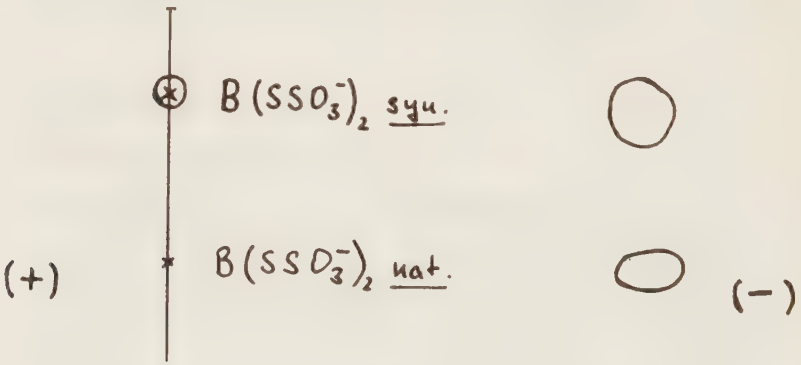
Abb. 14 IR-Spektrum von natürlicher Bis-thiosulfat-B-Kette

Das synthetische Material zeigt eine starke Absorption zwischen 1050 und 1150 cm^{-1}, die bei dem natürlichen Derivat nicht beobachtet wird. Dadurch wird auch die typische S-O-Bande teilweise verdeckt.

Niederspannungselektrophorese

Das Pherogramm wird auf Papier angefertigt. Die angelegte Spannung beträgt 4,28 V/cm, die Dauer 16 Stdn. Als Laufmittel kommt ein Harnstoff/Ameisensäure-Puffer mit pH 2,2 (4 m Harnstoff, 3 m Ameisensäure) zur Anwendung; die Entwicklung erfolgt mit Pauly's Reagens.

Zum Vergleich wurde natürliche Bis-thiosulfat-B-Kette des Rinderinsulins aufgetragen.



Die Laufstrecke entspricht der von natürlicher Bis-thiosulfat-B-Kette. Bei dem synthetischen Derivat verbleibt ein Teil der aufgetragenen Substanz am Start.

5.6. Aktivitätstest

5.6.1. Reduktion von natürlicher Tetra-thiosulfat-A-Kette

13 mg natürliche Tetra-thiosulfat-A-Kette des Rinderinsulins werden in 3,3 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit 0,1 n Essigsäure auf pH 5 eingestellt.
Bei 0°C wird mit 0,65 ml 2-Mercaptoethanol versetzt. Es wird mehrmals evakuiert und mit Stickstoff belüftet. Dann wird unter Stickstoff auf dem kochenden Wasserbad 6 min erhitzt. Danach wird im Eisbad abgekühlt. In Abwandlung der Originalvorschrift (113) wird zur Entfernung des Mercaptoethanols eingefroren und lyophilisiert.

5.6.2. Darstellung von Hybridinsulin

Das Lyophilisat wird mit 3,25 mg synthetischer Bis-thiosulfat-B-Kette des Humaninsulins vermengt und in 4,5 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wird mit 1 n NaOH auf 9,6 eingestellt. Mit 0,1 m Glycin-Puffer pH 9,6 wird auf 6,5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.
Die Autoxidation des Kettengemisches wird 22 Stdn. bei 4°C unter Luftzutritt durchgeführt.

5.6.3. Aktivitätstest (118)

Die entstandene Lösung von Hybridinsulin wird direkt im Mäusefalltest auf biologische Aktivität untersucht. Der Test wurde im Institut für Biochemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. U. Weber durchgeführt. Es kommen 30 Mäuse mit einem Gewicht von 10-14 g zum Einsatz. Nach intraperitonaler Applikation der Lösung

beobachtet man die Krampfneigung der Tiere infolge Hypoglykämie.
Der Test erbringt eine signifikante biologische Aktivität von 1,0 %. Werden natürliche A- und B-Kette nach dem oben beschriebenen Verfahren miteinander verknüpft, so liegt die biologische Aktivität zwischen 4 und 8 %.

III. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, die B-Kette des Humaninsulins nach der Liquid-Phase-Methode darzustellen.

Nach Fixierung der C-terminalen Aminosäure über ein säurelabiles Zwischenglied an den löslichen Träger Polyethylenglykol erfolgte der Aufbau des Peptids unter weitgehend standardisierten Bedingungen. Die Löslichkeit des Polymerpeptids war während der ganzen Synthese gut, so dass immer in erprobten Lösungsmitteln wie Methylenchlorid und Dimethylformamid gearbeitet werden konnte. Die Kupplungen verliefen quantitativ. Nur bei den Aminosäuren Histidin und Asparagin konnte auch durch Nachkupplung kein vollständiger Umsatz erreicht werden. Es entstanden dadurch Fehlsequenzen, die später vom gewünschten Produkt nicht abgetrennt werden konnten. Ausserdem führte die langdauernde Behandlung mit Trifluoressigsäure zu einer teilweisen Zerstörung von Tyrosin.

Am Ende der Synthese lag das Peptid in hoher Ausbeute polymer gebunden vor. Die acidolytische Abspaltung vom polymeren Träger mit Fluorwasserstoff verlief mit sehr schlechten Ausbeuten. Der daher eingeschlagene Weg der alkalischen Hydrolyse des Peptid-Benzylesters erbrachte wesentlich bessere Ausbeuten. Allerdings trat dann bei einigen Aminosäuren hohe Racemisierung auf.

Die nach oxydativer Sulfitolyse erhaltene Bis-thiosulfat-B-Kette stimmte bezüglich Elektrophorese, IR-Spektroskopie und Aminosäureanalyse recht gut mit dem gleichen Derivat natürlichen Ursprungs überein. Der nach Rekombination mit natürlicher A-Kette durchgeführte Mäusefalltest erbrachte biologische Aktivität. Das erhaltene Produkt enthielt also zu einem grossen Teil die gewünschte Bis-thiosulfat-B-Kette des Humaninsulins.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die Synthese von grösseren Polypeptiden nach der Liquid-Phase-Methode prinzipiell möglich ist. Es gelingt durch den Einfluss des polymeren Trägers, immer in homogener Lösung zu arbeiten. Die Aktivierung der Aminosäurederivate mit Dicyclocarbodiimid ist aber nicht in allen Fällen ausreichend. So müssen bei einer Wiederholung dieser Synthese Wege gefunden werden, Histidin und Asparagin quantitativ umsetzen zu können. Ebenso muss Tyrosin so geschützt werden, dass es unter den Synthesebedingungen erhalten bleibt.

Das Ziel in der Liquid-Phase-Methode, eine schonende und bezüglich der Ausbeute befriedigende Abspaltungsmethode vom polymeren Träger zu finden, muss erreicht werden. Die kürzlich veröffentlichte Fixierung des Peptids an das Polymer über eine photolabile Ankergruppe (152) könnte dieses Problem lösen.

Kinetische Untersuchungen von Fragmentkupplungen wurden durchgeführt. Ein Tripeptid-Aktivester wurde mit den Polyethylenglykolestern von Glycin und Triglycin umgesetzt. Die gleichen Reaktionen wurden, um einen Vergleich mit der klassischen Peptidsynthese zu erhalten, mit den entsprechenden Ethylestern durchgeführt. Alle Reaktionen verliefen kinetisch einheitlich, und die Geschwindigkeitskonstanten lagen in der selben Grössenordnung.

Die gleichen Reaktionen waren schon mit einem Mono-Aminosäure-Aktivester durchgeführt worden. Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeitskonstanten der Fragmentkupplungen etwa doppelt so gross waren wie bei der normalen Aminosäurekupplung.

IV. LITERATURVERZEICHNIS

1) E. Wünsch in Houben-Weyl, "Methoden in der Organischen Chemie" Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Bd. XV/1, 1974
2) H.D. Jakubke und H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine", Akademieverlag Berlin 1973
3) M. Bodansky und M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York 1966
4) E. Schröder und K. Lübke, The Peptides 1, Academic Press, New York und London 1965
5) J.C. Seehahn und G.P. Hess, J.Am.Chem.Soc. 77, 1067 (1955)
6) T. Curtius, Chem.Ber. 35, 3226 (1902)
7) R.A. Boissonas, Helv.Chim.Acta 34, 874 (1951)
8) T. Wieland, W. Kern und R. Sehring, Ann.Chem. 569, 117 (1950)
9) M.A. Tilak, Tetrahedron 11, 849 (1970)
10) R. Schwyzer und P. Sieber, Nature 199, 172 (1963)
11) E. Wünsch, Z.Naturforsch. 22b, 1269 (1967)
12) M. Bodansky, M.A. Ondetti, S.D. Levine und N.J. Williams, J.Amer.Chem.Soc. 89, 6753 (1967)
13) M. Bodansky und N.J. Williams, J.Amer.Chem.Soc. 89, 685 (1967)
14) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Breuer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda und H. Zahn, Z.Naturforsch. 18b, 1120 (1963)
15) R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2149 (1963)
16) G. Losse, C. Madlung und P. Lorenz, Chem.Ber. 101, 1257 (1968)
17) N. Inukai, K. Nakano und M. Murakani, Bull.Chem.Soc. (Japan) 41, 182 (1968)
18) E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung und W. Parr, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, 759 (1971)

19) C.G. Horvath, B.A. Preiss und S.R. Lipsky, Anal.Chem. 39, 1422 (1967)
20) G.P. Vlasow und A.Y. Bilibin, Izv.Akad.Nauk. (UdSSR) Ser.Khim. 1969, 1400
21) A. Loffet und J. Close, "Proc. 9th Europ. Peptide Symp." Orsay 1968, North-Holland Publishing Comp. Amsterdam 1968
22) W. Voelter, K. Zech und N. Grubhofer, Z.Naturforsch. 28b, 625 (1973)
23) H. Eckstein, Dissertation Unversität Tübingen 1970
24) E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W.A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier und W. Parr, J.Amer.Chem.Soc. 92 1736 (1970)
25) E. Wünsch, Angew.Chem. 83, 773 (1971)
26) L.C. Dorman, Tetrahedron Letters 1969, 2319
27) K. Esko, S. Karlsson und J. Porath, Acta Chem.Scand. 22, 3342 (1968)
28) A. Losse, Tetrahedron Letters 1971, 4989
29) G. Losse und R. Ulbrich, Tetrahedron 28, 5823 (1972)
30) H. Hagenmaier, Tetrahedron Letters 1970, 293
31) E. Bayer und H. Hagenmaier, Tetrahedron Letters 1968, 2037
32) J.M.P. Manning, J.Amer.Chem.Soc. 90, 1348 (1968)
33) H. Takashina, R.B. Merrifield und V. du Vigneaud, J. Amer.Chem.Soc. 90, 1323 (1968)
34) R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 86, 304 (1964)
35) J.M. Stewart, Federation Proc. 27, 63 (1968)
36) A. Marglin und R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 88, 5051 (1966)
37) B. Gutte und R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 91, 501 (1969)
38) B. Hemmasi und E. Bayer, Int.J.Peptide Protein Res. 9, 63 (1977)
39) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, J.Amer. Chem.Soc. 88, 3164 (1966)

40) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, Biochemistry 11, 466 (1972)
41) D.A. Laufer, T.M. Chapman, D.I. Malborough, V.M. Vaidya und E.R. Slout, J.Amer.Chem.Soc. 90, 2696 (1968)
42) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, J.Amer. Chem.Soc. 90, 2953 (1968)
43) R.L. Letsinger und M.J. Kornet, J.Amer.Chem.Soc. 85, 3045 (1963)
44) R.L. Letsinger, M.J. Kornet, V. Mahadevan und D.M. Jerina, J.Amer.Chem.Soc. 86, 5263 (1964)
45) M.M. Shemyakin, Y.A. Ovchinnikov, A.A. Kiriushkin und I.V. Kozhevmikova, Tetrahedron Letters 27, 2323 (1965)
46) R.H. Andreatta und H. Rink, Helv.Chim.Acta 56, 1205 (1973)
47) M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer, Angew.Chem. 83, 883 (1971)
48) E. Bayer und M. Mutter, Nature (London) 237, 512 (1972)
49) M. Mutter, Dissertation Universität Tübingen 1972
50) M. Mutter, R. Uhmann und E. Bayer, Liebigs Ann.Chem. 1975, 901
51) E. Bayer und M. Mutter, Chem.Ber. 107, 1344 (1974)
52) M. Mutter und E. Bayer, Angew.Chem. 86, 101 (1974)
53) E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmann, J. Polster und H. Mauser, J.Amer.Chem.Soc. 96, 7333 (1974)
54) L.C. Dorman, Tetrahedron Letters 1969, 2319
55) K. Brunfeld, P. Roepstorff und J. Thomson, Acta Chem. Scand. 23, 2906 (1969)
56) M. Schattenberg, Dissertation Universität Tübingen 1975
57) M. Weigele, S.L. DeBernardo, J-P. Tengi und W. Leimgruber, J.Amer.Chem.Soc. 94, 5927 (1972)
58) A. Felix und M.H. Jiminez, J.Chromat. 89, 361 (1974)
59) R. Uhmann, Dissertation Universität Tübingen 1971
60) W. Woiwode, Dissertation Universität Tübingen 1977
61) U. Heitmann, Dissertation Universität Tübingen 1978
62) H. Albrecht, Dissertation Universität Tübingen 1978

63) W. Stein, Dissertation Universität Tübingen 1976
64) W. Göhring, Dissertation Universität Tübingen 1974
65) H. Frank und H. Hagenmaier, Experientia 31, 131 (1975)
66) H. Frank, H. Meyer und H. Hagenmaier, Chemiker-Zeitung 101, 188 (1977)
67) H. Frank, H. Hagenmaier, E. Bayer und D.M. Desiderio in E. Gross und J. Meienhofer, "Peptides: Chemistry, Structure, Bonding", Ann Arbor Sci.Publ. (1977)
68) G. Jung, G. Bovermann, W. Göhring und G. Heusel in Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Proc. 4th Amer.Pept.Symp., Ann Arbor Sci.Publ. 1975
69) G. Heusel, G. Bovermann, W. Göhring und G. Jung, Angew.Chem. 89, 681 (1977)
70) G. Heusel, Dissertation Universität Tübingen 1978
71) Reinhard Eberle, Diplomarbeit Universität Tübingen 1976
72) F. Sanger, Biochem.J. 45, 563 (1949)
73) A.P. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith und R. Kitai, Biochem. J. 60, 541 (1955)
74) D.F. Steiner und P. Oyer, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 57, 473 (1967)
75) R.E. Chance, R.M. Ellis und W.W. Bromer, Science 161, 165 (1968)
76) K. Lübke und H. Klostermeyer, Advances Enzymol. 33, 445 (1970)
77) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda und H. Zahn, Z.Naturforsch. 18b, 1120 (1963)
78) H. Zahn, Naturwissenschaften 54, 396 (1967)
79) P.G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki und M. Tilak, J.Amer.Chem.Soc. 86, 930 (1964)
80) Y.-T. Kung et al. Sci.Sin. 14, 1710 (1965)
81) R.B. Merrifield und A. Marglin in Peptides 1966, North-Holland Publishing Comp. Amsterdam 1967
82) U. Weber, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 1715 (1967)

83) U. Weber und M. Andre, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 701 (1975)
84) R. Geiger, Chemiker-Ztg. 100, 111 (1976)
85) P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Johl, B. Riniker und W. Rittel, Helv.Chim.Acta 57, 2617 (1974)
86) D.F. Steiner und J.L. Clark, Proc.nat.Acad.Sci. USA 60, 622 (1968)
87) P.T. Varandani und M.A. Nafz, Arch.Biochem. and Biophys. 141, 533 (1970)
88) J. Meienhofer und E. Schnabel, Z.Naturforsch. 20b, 661 (1965)
89) P.G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut, J.Amer.Chem. Soc. 88, 164 (1966)
90) T. Okuda und H. Zahn, Makromolek. Chem. 121, 87 (1969)
91) P.G. Katsoyannis, C. Zalut, A. Tometsko, M. Tilak, S. Johnson und A.C. Trakatellis, J.Amer.Chem.Soc. 93, 5871 (1971)
92) P.G. Katsoyannis, J. Ginos, C. Zalut, M. Tilak, S. Johnson und A.C. Trakatellis, J.Amer.Chem.Soc. 93, 5877 (1971)
93) G. Losse, Z.Chem. 18, 330 (1978)
94) W. König und R. Geiger, Chem.Ber. 103, 2041 (1970)
95) B. Hemmasi und E. Bayer, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 481 (1974)
96) U. Weber und P. Hartter, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 351, 1383 (1970)
97) H. Hagenmaier und H. Frank, Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 353, 1973 (1972)
98) B.W. Erickson und R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 95, 3750 (1973)
99) E. Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 674, 218 (1963)
100) E. Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 667, 171 (1963)
101) E. Schnabel, Z.Naturforsch. 19b, 120 (1963)
102) P.G. Katsoyannis, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2673 (1963)
103) J. Meienhofer, Liebigs Ann.Chem. 692, 231 (1966)

104) K.B. Mathur, H. Klostermeyer und H. Zahn, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 346, 60 (1966)
105) G. Losse, B. Meisegeier, M. Mauck und H. Klengel, Tetrahedron 33, 1993 (1977)
106) V.K. Naithani und J. Föhles, Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 359, 1173 (1978)
107) M. Bergmann und L. Zervas, Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 1192 (1932)
108) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, M. Okada und Y. Kishida in Peptides (1966), North-Holland Publishing Comp. Amsterdam 1967
109) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada und H. Sugihara, Bull.Chem.Soc. (Japan) 40, 2164 (1964)
110) J. Bailey und R.D. Cole, J.biol.Chemistry 234, 1733 (1959)
111) U.E. Loening, Biochem.J. 66, 18 P (1957)
112) H. Zahn und E. Drechsel, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 359 (1968)
113) P.G. Katsoyannis und A. Tometsko, Biochemistry 55, 1554 (1966)
114) P.G. Katsoyannis, A.C. Trakotellis, S. Johnson, C. Zalut und G. Schwartz, Biochemistry 56, 2642 (1967)
115) K.L. Smith, Methods in Hormone Research, Academic Press, New York 1962
116) J. Vallance-Owen und P.H. Wright, Physiol.Rev. 40, 219 (1960)
117) A.E. Renold, D.B. Martin, Y.M. Dagenais, J. Steinke, R.J. Nickersen und M.C. Sheps, J.Clin.Invest. 39, 1487 (1960)
118) D.M. Young und A.H. Lewis, Science 105, 368 (1947)
119) E. Bayer, E. Gil-Av, W.A. König, S. Nakaparskin, J. Oro und W. Parr, J.Amer.Chem.Soc. 92, 1738 (1970)
120) H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J.Chromat.Sci. 15, 174 (1977)
121) H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J.Chromat. 146, 197 (1978)

122) V. Gut und J. Rudinger in Peptides (1968), North-Holland Publishing Comp. Amsterdam 1968
123) R. Eberle, Diplomarbeit Universität Tübingen 1976
124) J. Polster, Dissertation Universität Tübingen 1974
125) H. Lachmann, H. Mauser, F. Schneider und H. Wenck, Z.Naturforsch. 266, 629 (1971)
126) H. Mauser und J. Polster, Z.Phys.Chem. 91, 108 (1974)
127) H. Mauser, Ullmanns Enzyklopädie der techn. Chemie Bd. II/1
128) H. Mauser, A. Niemann und R. Kretschmer, Z.Naturforsch. 276, 1349 (1972)
129) W. Schoknecht, Dissertation Universität Tübingen 1979
130) D.W. Urry, Adv.Exp.Med. and Biol. 43, 211 (1974)
131) D.H. Spackman, W.H. Stein und S. Moore, Anal.Chem. 30, 1185 (1958)
132) D.J. McCaldin, Chem.Rev. 60, 39 (1960)
133) R.A. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner, Helv.Chim.Acta 44, 2022 (1961)
134) F. Reindel und W. Hoppe, Chem.Ber. 87, 1103 (1954)
135) G. Pataki, J.Chromat. 12, 541 (1963)
136) K. Bürger, Z.Anal.Chem. 196, 251 (1963)
137) K. Bürger, Z.Anal.Chem. 224, 421 (1967)
138) L. Carpino, J.Amer.Chem.Soc. 81, 855 (1959)
139) E. Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 702, 188 (1967)
140) S. Guttmann und R.A. Boisonnas, Helv.Chim.Acta 41, 1964 (1958)
141) K. Schlögel und H. Fabischowitz, Mh.Chem. 84, 950 (1953)
142) T. Mizoguchi, G. Levin, D.W. Wooley und J.M. Stewart, J.Org.Chem. 33, 903 (1968)
143) J.S. Morley, J.Chem.Soc. 1967, 2410
144) J.M. Stewart und J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman, San Francisco Calif. 1969
145) C.H. Li, D. Yamashiro und S. Lemaire, Biochemistry 14, 953 (1975)

146) O. Nishimura und M. Fujino, Chem.Pharm.Bull. 24, 1568 (1976)

147) K.H. Deimer, P. Thamm und P. Stelzel in Houben-Weyl, Methoden der Org. Chemie, Band XV/1, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974

148) W.C. Baumann und J. Eichhorn, J.Amer.Chem.Soc. 69, 2830 (1947)

149) E. Bayer, M. Mutter und G. Holzer in Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Ann Arbor Science Publ. 1975

150) H. Hagenmaier und M. Mutter, Tetrahedron Letters 1974, 767

151) H. Morawetz in Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Ann Arbor Science Publ. 1975

152) F.-S. Tjoeng, W. Staines, S. St.-Pierre und R.S. Hodges, Biochim.Biophys.Acta 490, 489 (1977)

Meine akademischen Lehrer waren Frau Professor Dr.
Kemmler-Sack und die Herren Professoren und Dozenten

E. Bayer, W. Braun, J. Gelinek, F. Gönnenwein, G. Häfelinger,
M. Hanack, G. Jung, G. Kortüm, W. Kraus, H. Krüger, D. Krug,
E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, E. Müller, M. Mutter,
H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Opitz, H. Pauschmann,
G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, W. Schweitzer,
F. Seelig, J. Strähle, E. Stumpp, H. Suhr, W. Voelter,
W. Zeil.

LEBENSLAUF

Am 3.11.1948 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Robert Eberle und dessen Ehefrau Annemarie geb. Geering in Stuttgart geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Stuttgart trat ich im April 1959 in das dortige Zeppelin-Gymnasium ein. Von 1962 bis 1967 war ich im Internat Urspringschule (Alb-Donau-Kreis), wo ich das Abitur ablegte. Von 1967 bis 1969 genügte ich meiner Wehrdienstpflicht.

Im Sommersemester 1969 begann ich in Tübingen das Chemie-Studium, legte im Herbst 1972 das Vordiplom ab und im Februar 1976 die Diplomhauptprüfung. Im August 1976 beendete ich unter der Leitung von Prof. Dr. E. Bayer meine Diplomarbeit über das Thema "Kinetische Untersuchungen von Fragmentkupplungen in der Liquid-Phase-Peptidsynthese".

Meine Dissertation entstand in der Zeit vom November 1976 bis September 1978 unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Bayer im Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen. Der Titel lautet: "Synthese der B-Kette des Humaninsulins mit der Liquid-Phase-Methode".

Im Mai 1977 heiratete ich Beate geb. Grübler, im März 1979 wurde unser Sohn Florian geboren.

Offsetdruck
GmbH & Co. KG.
86 Bamberg Hohe-Kreuz-Str. 9b

M. SCHADEL

» Tel. 0951/54414 » 58461 «